



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

BIOFUNKCIONALIZACE DEPONOVANÝCH KVANTOVÝCH TEČEK

BIOFUNCTIONALIZATION OF DEPOSITED QUANTUM DOTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

JANA JAKUBECHOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. JANA DRBOHLAVOVÁ, Ph.D.

BRNO 2013



**VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ**

**Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií**

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor

Biomedicínská technika a bioinformatika

Studentka: Jana Jakubechová

ID: 137238

Ročník: 3

Akademický rok: 2012/2013

NÁZEV TÉMATU:

Biofunkcionalizace deponovaných kvantových teček

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Nastudujte problematiku funkcionalizace kvantových teček, zejména fixovaných na pevném substrátu, které lze využít jako fluorescenční detekční systém pro různé biologicky významné látky, například proteiny či nukleové kyseliny. Zaměřte se na biokonjugaci vybraných biomolekul s povrchem zlata. 2) Provedte funkcionalizaci povrchů kvantových teček vybranými biomolekulami v různém rozsahu koncentrací. Pro tuto funkcionalizaci vyberte jednoho zástupce ze skupiny proteinů a jeden typ nukleové kyseliny. 3) Experimentálně ověřte navázání vybrané biomolekuly na povrch kvantových teček sledováním změny jejich optických (fluorescenčních) vlastností. 4) Ze získaných emisních spekter vyhodnoťte vliv koncentrace biomolekul na úbytek (ev. zvýšení) intenzity fluorescence kvantových teček.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] DRBOHLAVOVA, Jana et al. Effect of Nucleic Acid and Albumin on Luminescence Properties of Deposited TiO₂ Quantum Dots. International Journal of Electrochemical Science. 2012, roč. 7, č. 2, s. 1424-1432. ISSN 1452-3981.

[2] TIWARI, Pooja M. et al. Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. Nanomaterials. 2011, roč. 1, s. 31-63. EISSN 2079-4991.

Termín zadání: 11.2.2013

Termín odevzdání: 31.5.2013

Vedoucí práce: Ing. Jana Drbohlavová, Ph.D.

Konzultanti bakalářské práce: doc. Ing. Jana Kolářová, Ph.D.

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

Abstrakt

Cieľom tejto práce je funkcionizácia deponovaných TiO_2 kvantových bodiek (ďalej len QDs) pripravených anodickou oxidáciou titánu prostredníctvom nanoporéznej masky z oxidu hlinitého na kremíkovom waferi a následne ich modifikácia zlatom v procese pulznej depozície. Konečným cieľom je pozorovanie vzniknutých zmien ich fluorescenčných vlastností v dôsledku naviazania biomolekúl. QDs vykazujú výborné optické vlastnosti, čo sa môže využiť pre označovanie a zobrazovanie v biologických systémoch. Vďaka ich unikátnej fotostabilite umožňujú dlhodobé pozorovanie biomolekúl.

Abstract

The goal of this bachelor thesis is to functionalize the deposited quantum dots (QDs). QDs are prepared thanks to nanoporous alumina template in process of anodic oxidation of Ti film on a silicon wafer followed with modification of gold in process of pulse deposition. The final objective is the subsequent observation of fluorescent properties changes. QDs shows outstanding optical characteristics which can be used for labeling and imaging in biological systems. Thanks to their unique fotostability, they allow long term observation of biomolecules.

Kľúčové slová

nanoštruktúry, QDs, modifikácia, funkcionizácia, fluorescenčná spektroskopia

Keywords

nanostructures, QDs, modification, functionalization, fluorescence spectroscopy

Bibliografická citácia diela

JAKUBECHOVÁ, J. *Biofunkcionalizace deponovaných kvantových teček*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií. Ústav biomedicínského inženýrství, 2013. 62 s., Vedoucí práce: Ing. Jana Drbohlavová, Ph.D..

Prehlásenie

Prehlasujem, že svoju bakalársku prácu na tému Biofunkcionalizace deponovaných kvantových tečiek som vypracovala samostatne pod vedením vedúcej bakalárskej práce a s použitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú všetky citované v práci a uvedené v zozname literatúry na konci práce.

Ako autorka uvedenej bakalárskej práce ďalej prehlasujem, že v súvislosti s vytvorením tejto bakalárskej práce som neporušila autorské práva tretích osôb, a ani som nezasiahla nedovoleným spôsobom do cudzích autorských práv osobnostných a/alebo majetkových a som si plne vedomá následkov porušenia ustanovenia § 11 a nasledujúcich zákona č. 121/2000 Sb., o práve autorskom, o právach súvisiacich s právom autorským a o zmene niektorých zákonov (autorský zákon), v znení neskorších predpisov, vrátane možných trestnoprávných dôsledkov vyplývajúcich z ustanovenia časti druhej, hlavy VI. diel 4 Trestného zákoníka č. 40/2009 Sb.

V Brne dňa 31.5.2013

.....

(podpis autora)

POĎAKOVANIE

Ďakujem vedúcej bakalárskej práce Ing. Jane Drbohlavovej, Ph.D. za odborný dohľad, vecné pripomienky a cenné rady pri spracovaní práce. Ďalej by som rada poďakovala tímu na Fakulte Chemickej VUT, ktorí mi umožnili meranie fluorescenčnej spektroskopie a všetkým, ktorí ma akýmkoľvek spôsobom podporili pri písaní tejto bakalárskej práce.

V Brne dňa 31.5.2013

.....

(podpis autora)

Obsah

Úvod	9
1 Nanoštrukturované povrchy	10
1.1 Príprava nanoštruktúr	10
1.1.1 Príprava anodickou oxidáciou	10
1.1.2 Príprava galvanickou depozíciou	11
1.2 Typy nanoštruktúr podľa tvaru	12
1.2.1 Nanobodky	12
1.2.2 Kvantové bodky	13
1.2.3 Nanovláčna a nanotrubičky	13
1.3 Analytické využitie nanoštrukturovaných povrchov	14
1.3.1 Fluorescencia	14
1.4 Optické vlastnosti jednotlivých QDs	15
1.4.1 Fluorescencia TiO ₂ nanočastíc	15
1.4.2 Fluorescencia zlatých nanočastíc	21
2 Metódy charakterizácie nanoštrukturovaných povrchov	22
2.1 Mikroskopické metódy	22
2.1.1 Skenovacia elektrónová mikroskopia	22
2.1.2 Röntgenová fotoelektrónová spektroskopia	23
2.1.3 Transmisná elektrónová mikroskopia	23
2.2 Spektroskopické metódy	24
2.2.1 Energiovo disperzná röntgenová spektroskopia	24
2.2.2 Fluorescenčná korelačná spektroskopia	24
3 Modifikácie, funkcionizácie a biomedicínske aplikácie nanoštruktúr	26
3.1 Modifikácia nanoštruktúr	26
3.2 Funkcionizácia nanoštruktúr	26

3.3	Biomedicínske aplikácie nanoštruktúr	27
3.3.1	PEGylácia/Polyetylén glykolizácia.....	28
3.3.2	Konjugácia bielkovín / aminokyselín	29
3.3.3	Nanočastice funkcionizované oligonukleotidmi.....	29
3.3.4	Protilátky.....	30
3.3.5	Thymopoietín II peptide fragment	30
4	Experimentálna časť	31
4.1	Použité chemikálie	31
4.2	Použité prístroje	31
4.3	Príprava vrstvy titánu a hliníka	31
4.4	Príprava TiO ₂ kvantových bodiek	32
4.5	Modifikácia TiO ₂ kvantových bodiek zlatom.....	32
4.6	Proces žihania	33
4.7	Príprava roztoku, biofunkcionalizácia	33
4.8	Charakterizácia pomocou SEM	33
4.9	Fluorescenčná charakterizácia	33
5	Výsledky a diskusia	35
5.1	Charakterizácia vzoriek pomocou SEM	35
5.1.1	Charakterizácia vrstiev titánu a hliníka	36
5.1.2	Charakterizácia TiO ₂ /Au nanoštruktúr vyrobených pri podmienkach: 5V; 3 M H ₂ SO ₄ ; 10 °C.....	36
5.1.3	Charakterizácia TiO ₂ /Au nanoštruktúr vyrobených pri podmienkach: 10 V; 2M H ₂ SO ₄ ; 10°C.....	38
5.1.4	Charakterizácia TiO ₂ /Au nanoštruktúr vyrobených pri podmienkach: 20V; 1M H ₂ SO ₄ ; 22°C.....	39
5.2	EDX analýza	40
5.3	Charakterizácia vzoriek pomocou fluorescenčného spektroskopu	40
5.3.1	Fluorescenčné vlastnosti povrchu držiaku na vzorky, Si, Al a Ti	41

5.3.2	Fluorescenčné vlastnosti TiO ₂ , TiO ₂ /Au QDs pripravených pri 5 V; 3 M H ₂ SO ₄ ; 10 °C.....	46
5.3.3	Fluorescenčné vlastnosti TiO ₂ , TiO ₂ /Au QDs pripravených pri 10 V; 2 M H ₂ SO ₄ ; 10 °C	50
5.3.4	Fluorescenčné vlastnosti TiO ₂ , TiO ₂ /Au QDs pripravených pri 20V 1M H ₂ SO ₄ 22°C.....	52
5.4	Biofunkcionalizácia thymopoietínom.....	54
5.4.1	Fluorescencia thymopoietínu.....	54
5.4.2	Fluorescenčné vlastnosti vzorku s TM	55
6	Záver	57
7	Zoznam skratiek	59
	Citácie	60

Úvod

Nanotechnológie nám ponúkajú škálu nanočastíc, ktoré sa dajú po ich modifikácií a funkcionalizácií široko využiť v biomedicínskom výskume na rôzne účely, ako je napríklad biozobrazovanie, doručovanie génov a liečiv, ale aj v terapeutike a diagnostike, pri vyhľadávaní zaujímavých buniek. Medzi nanočastice, ktoré sú nositeľmi takýchto vlastností patria kvantové bodky. V oblasti výskumu získali špeciálnu pozornosť vďaka ich optickým a elektrochemickým vlastnostiam. QDs vykazujú omnoho väčšiu fluorescenciu ako ostatné látky (organické fluorofory, farbivá), ktoré sa využívajú v bioanalytických aplikáciách. Pre výskum a zobrazovanie *in vivo* sú vhodnejšie koloidné (CdTe) QDs, pre *in vitro* aplikácie zase deponované (TiO₂) QDs.

Biokompatibilita QDs v medicínskych aplikáciách sa často stretáva s problémom toxicity, preto vedci museli skúmať iné materiály, ktoré by odvrátili toto potenciálne nebezpečenstvo. Táto bakalárska práca je zameraná práve na TiO₂ kvantové bodky v deponovanej forme, ktoré nevykazujú toxicitu a sú vhodnými kandidátmi pre *in vitro* biomedicínske aplikácie. Titán je navyše charakteristický špeciálnou poréznou vlastnosťou, ktorá sa využíva v anodickej oxidácii a tak umožňuje ich ľahkú a lacnú syntézu. Cieľom práce je takto pripravené QDs vhodne modifikovať zlatom a vplyvom funkcionalizácie biomolekúl sledovať ich zmenu vo fluorescenčných vlastnostiach.

1 Nanoštrukturované povrchy

V posledných rokoch sa v biomedicínskom výskume rozšírilo použitie kovových a polovodičových nanočastíc ako napríklad zlato, striebro, oxid titaničitý, oxid železitý. Veľké uplatnenie majú v terapii a diagnostike vďaka ich vynikajúcim vlastnostiam ako sú malé rozmery, veľká povrchová plocha, vysoká reaktivita k žijúcim bunkám, translokácia do buniek a stabilita aj napriek vysokým teplotám. Nanočastice sa môžu vyskytovať v rôznych tvaroch a rozmeroch. Sú schopné zlučovať sa s ostatnými nanočasticami v ich okolí. Dôležité sú ich optické vlastnosti, ktoré sa využívajú v zobrazovacích aplikáciách [1].

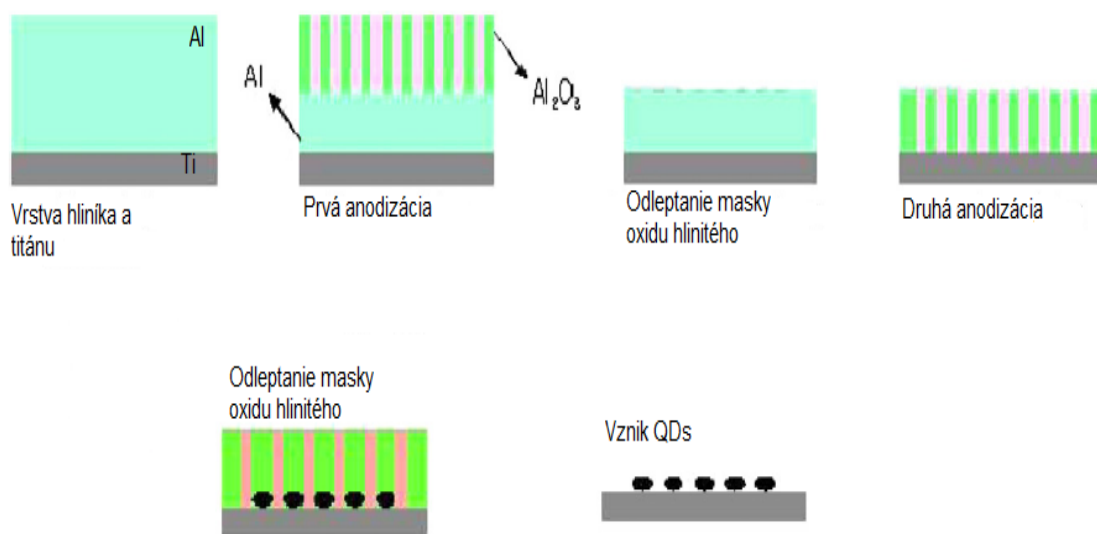
1.1 Príprava nanoštruktúr

Vo všeobecnosti existuje celá rada spôsobov, prostredníctvom ktorých sa dajú nanoštruktúry pripraviť. Keďže je táto bakalárska práca zameraná na kvantové bodky (angl. QDs) v deponovanej forme, budem sa zaoberať spôsobom prípravy QDs pomocou „template based methods“ - metóda využívajúca k výrobe nanoštruktúr tzv. šablónu resp. masku. Výhodou výroby rôznych nanoštruktúr fixovaných na pevných látkach je ich jednotná veľkosť a priestorová distribúcia [2].

1.1.1 Príprava anodickou oxidáciou

Anodická oxidácia predstavuje vzhľadom k litografickým metódam lacnú a rýchlu metódu na prípravu nanoštrukturovaných povrchov. Medzi najpoužívanejšie materiály patrí nanoporézna membrána z anodizovaného oxidu hliníka (angl. anodized aluminium oxide). Vysoko štruktúrované AAO masky sa vyrábajú pomocou anodickej oxidácie hliníka za použitia kyslého elektrolytu. Pri procese anodizácie na titánovej alebo hliníkovej vrstve rastie oxid príslušného kovu, ktorý vyplňa póry. Ak je vytvorená nanoštruktúra len na začiatku póru, hovoríme o nanobodkách, ale ak preniká po celej jeho dĺžke, hovoríme o nanostĺpikoch. Póry vytvorené anodickou oxidáciou sú organizované do buniek, ktoré sa nachádzajú v tesnej blízkosti a vytvárajú hexagonálnu štruktúru. Tieto nanopóry majú jednotný priemer, dĺžku a medzipórovú vzdialenosť. Priemer a hustota nanopórov v šablóne môže byť v rozmedzí od 3 nm až do 500 nm vďaka anodizačným podmienkam ako anodizačné napätie, čas a druh elektrolytu. Zvyčajne platí, že vplyvom nižšieho napätia vznikajú menšie póry s väčšou hustotou a lepšou homogenitou. Pri menšej teplote rastú póry pomalšie, čím je dosiahnutá ich lepšia jednotnosť. Jednotnosť šablóny môže byť taktiež ovplyvnená počtom

anodizačných krokov. Dobré výsledky sa vykazujú pri dvoj a troj krokovej anodizácii. Pri procese anodizácie hrá veľkú rolu výber elektrolytu. Pri výrobe hliníkovej masky je najviac používaný vodný roztok kyseliny sírovej, šťaveľovej, alebo fosforečnej v nízkej koncentrácii. Najmenšia veľkosť pórov je všeobecne dosiahnutá vplyvom kyseliny sírovej, ktorá sa bežne používa pri nízkom konštantnom napätí (v rozsahu od 18 V až 30 V), v porovnaní s kyselinou šťaveľovou (konštantné napätie 30-60 V). Najväčšia veľkosť pórov je dosiahnutá v prípade kyseliny fosforečnej. Dĺžka AAO nanokanálikov sa pohybuje v rozmedzí 0,1-300 μm . Vďaka hexagonálnemu usporiadaniu je hustota pórov v rozmedzí 10^8 - 10^{11} na cm^2 [2-4].



Obr. 1 Postup prípravy kvantových bodiek v procese dvojkrokovej anodizácie [5].

1.1.2 Príprava galvanickou depozíciou

Táto metóda predstavuje taktiež jednoduchú a rýchlu cestu ako syntetizovať nanoštruktúry vzácnych kovov pomocou šablóny s vysokým výťažkom a rôznou morfológiou. Galvanická depozícia je známa ako elektrochemická depozícia, alebo jednoduchšie povedané elektrodpozícia. Výroba nanočastíc spočíva vo vložení vodivého substrátu s poréznou nevodivou maskou do elektrolytu. Vodivý substrát predstavuje katódu. Po nastavení konštantného prúdu medzi dvoma elektródami sú kovové ióny priťahované katódou. Po kompletnej depozícii sa porézna maska zvyčajne vyleptá. Vo výrobe nanočastíc hrá veľkú rolu elektrolyt, ktorý prúdi medzi vodivým substrátom a poréznou nevodivou maskou. Po aplikácii konštantného prúdu medzi

dvoma elektródami sú ióny kovu priťahované katódou [2]. Galvanická depozícia nanoštruktúr vzácnych kovov do hliníkovej masky na titáne je teda založená na výmennej reakcii poháňanej galvanickým článkom, ktorý je tvorený medzi titánom a deponovaným zlatom v roztoku [6]. V priemysle je galvanická depozícia široko používaná vo výrobe kovových vrstvičiek, v procese známom ako elektroplatinovanie. Vo všeobecnosti sa táto metóda môže aplikovať iba na elektricky vodivé látky ako sú kovy, zliatiny, polovodiče, elektricky vodivé polyméry a oxidy [2].

1.2 Typy nanoštruktúr podľa tvaru

Priemer nanočastíc a ich vzájomná vzdialenosť je daná tzv. porozitou masky. Vytvorenie špecifického typu nanoštruktúr závisí od masky a elektrodepozičných podmienok. Dĺžka vzniknutých nanoštruktúr je priamo úmerná veľkosti prúdu a anodizačnému/elektrodepozičnému času. Veľkosť nanoštruktúr je taktiež ovplyvnená teplotou, koncentráciou roztoku, elektrickým potenciálom a pH roztoku. Medzi takto vzniknuté nanoštruktúry zaradzujeme nanobodky, nanotyčinky, nanotrubičky a nanovlákná [2].

1.2.1 Nanobodky

Dôležitý parameter, ktorý určuje kvalitu pripravených nanoštruktúr je hrúbka šablóny filmu. V prípade nanobodiek vedci objavili, že tenšia šablóna je omnoho výhodnejšia, pretože sa dosahuje vyššia hustota poľa QDs. Hrúbka musí byť maximálne 3 až 5 krát vyššia ako veľkosť póru v šablóne. Na prípravu nanobodiek môže byť použité veľké množstvo rôznych materiálov. Používaným materiálom vo výrobe kvantových bodiek použitím AAO šablóny je oxid titaničitý. Skupina výskumníkov na čele s Chen P. L.[7] sa intenzívne zaoberala jednotnosťou štruktúr nanobodiek pripravených elektrochemickou anodizáciou Al/Ti vrstiev na kremíku, Al/TiN dvojvrstvy na zafíre alebo TiN/Al vrstiev na kremíkovom substráte. V prvom prípade autori použili samo-organizované polia nanobodiek ako zdroje elektrónovej emisie v triódach s elektrónovou emisiou. V druhej spomínanej práci zistili, že fázový vývin izolovaných TiO₂ nanobodiek je iný oproti TiO₂ nanobodkám vo forme tenkých filmov a práškov. Po žíhaní pri vysokej teplote sú nanobodky polykryštalické a skladajú sa zo zmiešanej fázy anatasu a rutilu namiesto jednej fázy rutilu. V treťom prípade pripravené nanobodky pozostávali z amorfneho TiO_x s hexagonálnym usporiadaním s priemerom okolo 60 nm. Chu [8, 9] a kolektív vytvoril TiO₂ nanobodky a nanotyčinky pomocou kombinovanej anodizácie Al/Ti vrstvy rozprášenej na sklenený substrát. Takéto

štruktúry môžu byť využité ako DNA senzory. Autori taktiež testovali elektrolyt na anodizáciu - zriedený roztok kyseliny dusičnej, aby vytvorili jednotný, organizovaný, nanoporézny film oxidu titaničitého s paralelnými cylindrickými pórmami (priemer pórov je približne 30 nm a hrúbka okolo 1100 nm). Po žíhaní pri teplote 600 °C po dobu 2 hodín, nanoporézne filmy oxidu titaničitého vykazujú vysokú fotokatalytickú aktivitu pod UV osvetlením [2].

1.2.2 Kvantové bodky

Kvantové bodky sú nanokryštály alebo atómové zoskupenia o veľkosti 2 - 20 nm. Pozostávajú z niekoľko stoviek až pár miliónov atómov, ale iba z malého počtu voľných elektrónov. V niektorej literatúre sa uvádza, že ich veľkosť by nemala byť väčšia ako 10 nm. Avšak ich rozmery závisia hlavne od materiálu, z ktorého sú pripravené. Zvyčajne ich tvoria kovy (nikel, kobalt, platina, zlato), polovodiče vždy zo skupín II.-VI (CdTe, CdSe, CdS, ZnSe, ZnS, PbS, PbSe, PbTe, SnTe) alebo zo skupín III.-V. (InP, GaAs, ...). Všeobecne hovoríme o kvantových bodkách, keď dochádza k efektu kvantového obmedzenia, ktorý je zodpovedný za ich atraktívne vlastnosti. Dochádza k nemu vtedy, keď polomer častice je menší ako Bohrov polomer elektrónu, diery alebo excitónu. Bohrov polomer je charakteristický pre každú látku (napr. 36 nm pre InAs, 0,7 nm pre CuCl, atď.) a práve preto nemôžeme s istotou povedať, či nanobodka menšia ako 20 nm patrí, alebo nepatrí medzi QDs. Všeobecne môžeme kvantový efekt v polovodičových štruktúrach rozdeliť do troch skupín, v závislosti na tom, v akom rozmere sa nachádza náboj. Obmedzenie v jednom smere vytvára dvojrozmerné štruktúry, ktoré sú nazývané ako kvantové filmy alebo kvantové jamy. Obmedzenie v dvoch smeroch spôsobuje jednorozmerné kvantové vlákna a obmedzenie v troch smeroch vytvára zmienené kvantové bodky alebo kvantové „krabičky“. Tam, kde sa nachádza veľká koncentrácia elektrónov sú štruktúry bezrozmerové. Vzhľadom na elektrónové obmedzenie rozlišujeme planárne, vertikálne a samoštrukturované QDs. Jedny z prvých pokusov boli prevádzané práve pomocou planárnych štruktúr. V planárnych a vertikálnych QDs vedie elektrostatické obmedzenie typicky do rozmerov okolo 100 nm a štruktúrne obmedzenie je 10 nm [2, 10].

1.2.3 Nanovlákná a nanotrubičky

Nanovlákná, zahŕňajúc Ni, Co, Cu a Au s priemerom medzi 10 a 200 nm vyrábané pomocou galvanickej depozície sú vytvárané pri nízkom pH a nanotrubičky pri vysokých hodnotách pH. Zistilo sa, že neexistuje žiadna korelácia medzi veľkosťou prúdu a typom nanoštruktúry. Pravdepodobnosť tvorenia nanotrubičiek v maske rastie

s veľkosťou pórov v maske. U nanovlákién majú nanopóry veľmi malý priemer (20 nm). Jednou z najväčších predností syntézy pomocou template-based methods pre rast nanotrubičiek a ich polí je nezávislá kontrola nad dĺžkou, priemerom a hrúbkou steny nanotrubičky. Zatiaľ čo dĺžka a priemer výsledných nanotrubičiek sú závislé na šablóne použitej pre syntézu, hrúbka steny nanotrubičky môže byť kontrolovaná počas rastu [2].

1.3 Analytické využitie nanoštrukturovaných povrchov

Nanoštrukturované povrchy sa dajú využiť hlavne ako senzory, ale taktiež aj ako biosenzory pre detekciu biomolekúl ako sú proteíny, nukleové kyseliny, lipidy, polysacharidy atď. Najčastejšie sa k detekciám využívajú elektrochemické a optické analytické metódy. Optické vlastnosti závisia od veľkosti QDs, čo je hlavný parameter, ktorý určuje pozíciu píkuv v spektre a intenzitu fotoluminiscencie. Ich veľkosť môže byť vypočítaná pomocou bežných techník ako je skenovacia elektrónová mikroskopia (SEM) alebo transmisná elektrónová mikroskopia (TEM).

1.3.1 Fluorescencia

Je druh luminiscencie, ktorá sa v biomedicíne využíva hlavne pri zobrazovaní štruktúr (buniek, tkanív) pomocou fluorescenčnej mikroskopie a spektroskopie a následnej analýzy obrazu, pri štúdiu zmeny konformácie a dynamiky. Elektrón je v excitovanom orbitále spárovaný (opačným spinom) s druhým elektrónom v orbitále základného stavu. Pri návrate elektrónu do základného stavu dochádza k emisii fotónov. Stupeň emisie (tzv. čas dohasínania) je zvyčajne 10^8 s^{-1} , čo znamená že fluorescencia trvá okolo 10 ns. Fluorescenčné emisné spektrum predstavuje závislosť intenzity fluorescencie a vlnovej dĺžky. Spektrum je závislé na chemickom zložení fluoroforu a roztoku, v ktorom je rozpustený. Fluorescenčné techniky sú založené na fluorimetrických detekciách. Ich princíp spočíva v tom, že skúmaný analyt je v tesnej blízkosti s biologickými receptormi (protilátky, enzýmy, DNA) označenými s fluoroforom, pričom je pozorovaná zmena v intenzite fluorescenčnej emisie. Táto zmena sa pripisuje zhášaniu, čo je proces ubúdania intenzity fluorescenčnej emisie v dôsledku nemenného stavu, kde kovalentne viazaný komplex zhášača (farbivo = akceptor elektrónov) a fluoroforu (donor elektrónu) absorbuje svetlo a vracia sa do základného stavu z excitovaného, alebo dynamického stavu, kde molekula zhášača difunduje do fluoroforu v excitovanom stave. Zhášanie je spôsobené funkčným podielom aromatických a alifatických aminov, molekulárneho kyslíka a konkrétnymi

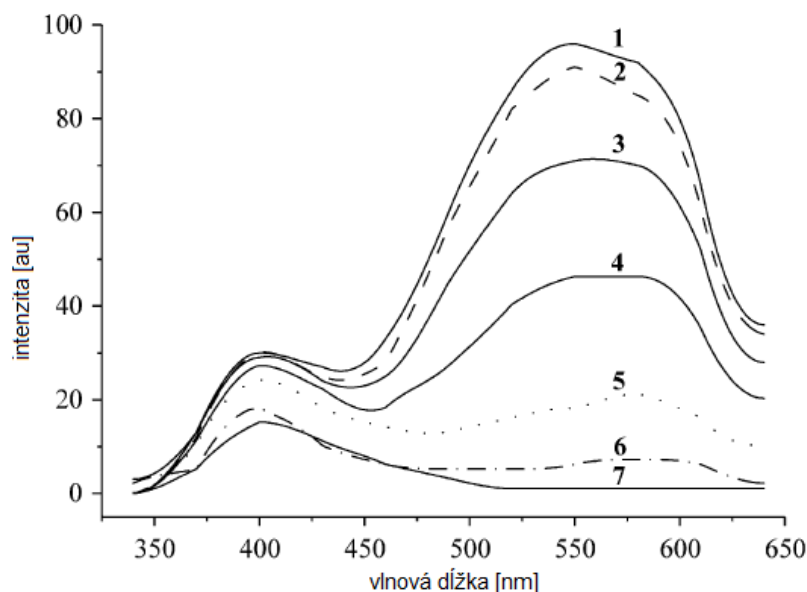
halogénmi. Emisia fluorescence ustupuje ak je fluorofor naviazaný na zhášači. Preto, ak je označovaný analyt nahradený zhášačom z fluoroforu vzrastá intenzita fluorescenčnej emisie [11].

1.4 Optické vlastnosti jednotlivých QDs

Luminiscenčné vlastnosti nanočastíc sa odvíjajú od mnohých faktorov. Keďže predmetom tejto práce sú TiO_2 kvantové bodky, je nutné do optickej analýzy zahrnúť všetky podmienky, ktoré by mohli eventuálne ovplyvňovať ich luminiscenciu. Nevýhodou však je, že neexistuje veľa vedeckých podkladov, ktorých by predmetom výskumu optických vlastností boli práve deponované QDs. Luminiscenciu ovplyvňuje v akej forme sa TiO_2 QDs nachádzajú (koloidná alebo deponovaná forma), ich kryštalografická fáza, veľkosť a v neposlednom rade aj skutočnosť či podliehajú fluorescencií čisté, alebo modifikované. TiO_2 má tri kryštalické fázy – anatas, rutil a brookit. Kryštalografickú štruktúru nadobúdajú TiO_2 QDs žihaním pri vysokých teplotách. Konkrétne žihaním na teplote okolo 400-600 °C sa amorfný oxid titaničitý mení na kryštalografickú formu anatasu. Vplyvom vyššej teploty – okolo 800 °C vzniká rutil a brookit vzniká pri teplote vyššej ako 1000 °C. V nasledujúcich podkapitolách sa nachádza luminiscencia niektorých TiO_2 a niektorých zlatých nanočastíc, ich emisné spektrum pri rôznych excitačných vlnových dĺžkach. Taktiež je spomenutá aj metóda prípravy a prístroj, na ktorom bola luminiscencia meraná, ak to autor uvádza.

1.4.1 Fluorescencia TiO_2 nanočastíc

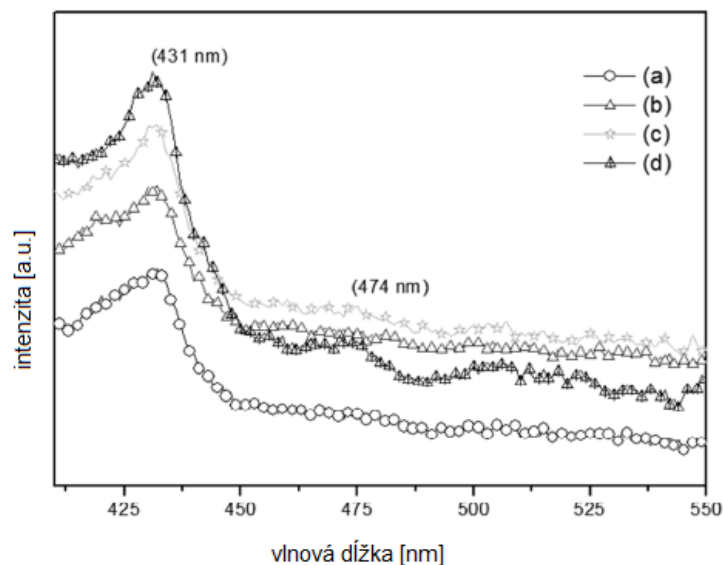
V prípade luminiscencie TiO_2 pri nízkych teplotách boli fotoluminiscenčné spektrá vyhodnocované vo fáze anatasu – žihanom pri 300 °C (A300), vo fáze rutilu – žihanom pri 300 °C a 900 °C (R300, R900). Proces žihania trval 5 hodín, pričom došlo k zmenám veľkosti nanočastíc, a to z 10-20 μm na 10-70 nm v prípade A300 a R300. R900 dosahoval po žihaní rozmery 60-70 nm. Excitačná vlnová dĺžka bola nastavená na 260 nm. Ako ukazuje Obr. 2, emisné spektrum anatasu pozostáva z dvoch širokých pík. Prvý pík o nižších vlnových dĺžkach (približne 400 nm) patrí fosforescencií a druhý pík pri vyšších vlnových dĺžkach (približne 545 nm) prislúcha fluorescencií [12].



Obr. 2 Emisné spektrá A300 anatasu pri rôznych teplotách (1–5, 2–20, 3–40, 4–60, 5–80, 6–100, 7–140, 8–180 K) [12].

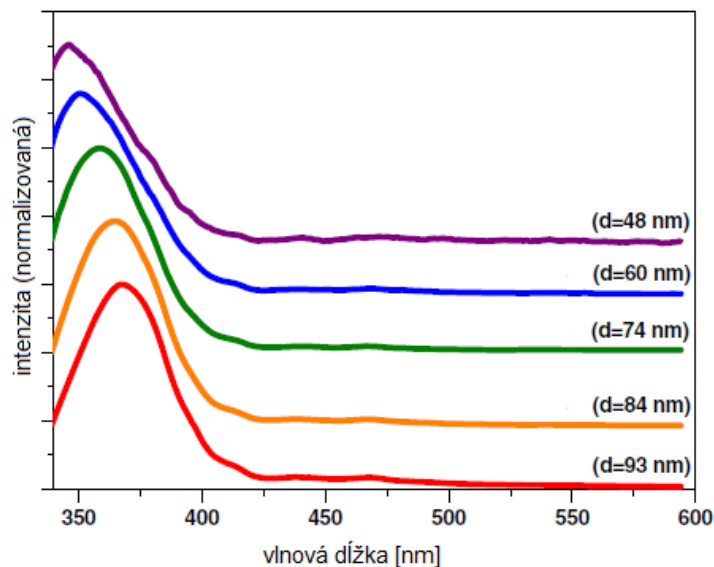
Behera et al. [13] modifikoval TiO_2 pomocou dusíka a disperzie zlatých nanočastíc. Štúdia ultrafialovej spektroskopie vo viditeľnej oblasti (UV-VIS) ukazuje, že TiO_2 absorpčný pás bol posunutý z oblasti UV do viditeľnej, práve kvôli dopovanému dusíku. TiO_2 dopovaný dusíkom vykazuje silnú luminiscenciu v porovnaní so samostatným titánom. Podobne TiO_2 , modifikovaný zlatom vykazuje intenzívnejšiu luminiscenciu. Emisné spektrá TiO_2 , Au/TiO_2 , $\text{TiO}_{2-x}\text{N}_x$ a $\text{Au/TiO}_{2-x}\text{N}_x$ boli získané pri excitácii 350 nm. Vzorky vykazujú píky pri 394, 450, 468, 482, 562, 572 a 668 nm. Bolo zistené, že všetky vzorky vykazujú silnú intenzitu emisie pri 468 nm až na samostatný TiO_2 . Avšak intenzita emisie TiO_2 je omnoho vyššia pri 668 nm v porovnaní s ostatnými vzorkami. TiO_2 vzorky boli pripravované pomocou metódy sol-gel a žihané pri 450 °C počas troch hodín. Veľkosť TiO_2 nanoštruktúr bola 22 nm a 21 nm pre TiO_2 dopované dusíkom.

Kumar et al. [14] syntetizoval TiO_2 nanočastice taktiež pomocou metódy sol-gel, pričom teplota žihania bola 350 °C, 550 °C, 750 °C a 900 °C počas 15 minút. Pri meraní fotoluminiscencie boli vzorky excitované pri 375 nm a široký pík emisie bol dosiahnutý pri 431 nm bez ohľadu na rôzne stupne žihania. Fotoluminiscenčné spektrá sú zobrazené na Obr. 3. Počas žihania od 350 °C do 900 °C vzrástla veľkosť nanočastíc zo 60 do 150 nm.



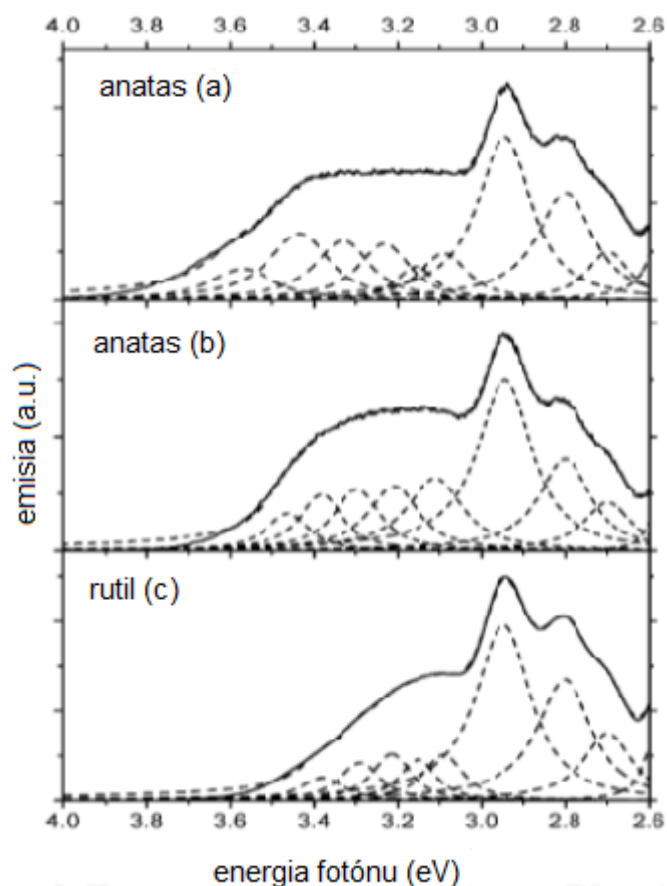
Obr. 3 Emisné spektrá nanočastíc TiO_2 žíhaných pri 350 °C (a), 550 °C (b), 750 °C (c), 900 °C (d). Excitácia: 370 nm [14].

Luo et al. [15] pozoroval luminiscenčné vlastnosti samoštrukturovaných TiO_2 bodiek pri pokojovej teplote a zistil, že so znižujúcimi sa rozmermi nanočastíc sa zvyšuje ich emisia. Všetky spektrá vykazujú výrazné píky v UV oblasti pripisované luminiscenciám v blízkosti zakázaného pásu. Intenzita môže priamo súvisieť s počtom luminiscenčných TiO_2 nanobodiek, čo znamená, že luminiscencia týchto nanobodiek sa objavuje v širokom rozsahu ich veľkostí. Úbytok intenzity nanobodiek môže vychádzať z narastajúcich povrchových stavov, ktoré sa chovajú ako pasce na elektróny či diery. Ako je ilustrované na Obr. 4, UV luminiscenčná energia sa posúva k vyšším hodnotám energie so znižujúcou sa veľkosťou nanobodiek. Píky UV luminiscencie sú lokalizované na 367 nm (3,38 eV), 365 nm (3,40 eV), 359 nm (3,45 eV), 351 nm (3,53 eV) a 346 nm (3,58 eV) pre nanobodky s veľkosťami 93 nm, 84 nm, 74 nm, 60 nm a 48 nm. Fotoluminiscenčné spektrá boli merané pri pokojovej teplote na fluorescenčnom spektrometre (Edinburgh Instruments, FLS920) použitím Xe lampy, pričom excitácia bola nastavená na 300 nm. Vzorky boli žíhané na 500 °C na vzduchu počas dvoch hodín.



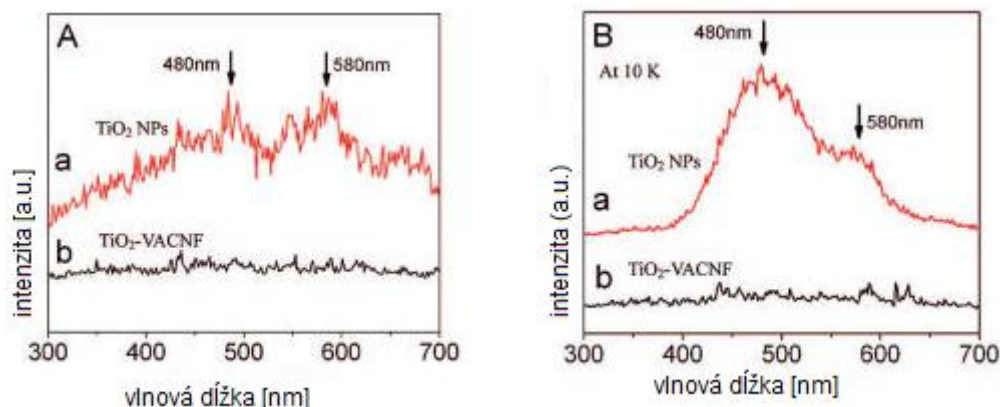
Obr. 4 Emisné spektrá rôzne veľkých TiO_2 nanobodiek žíhaných na 500°C pri excitácii 300 nm [15].

Ďalšia skupina vedcov pozorovala fotoluminiscenciu (FL) dvoch kryštalografických fáz – anatasu a rutilu, ktoré mali zreteľne rozdelené píky vo viditeľnej oblasti s kvantovým výťažkom pri izbovej teplote. FL spektrá anatasu pripraveného dvoma odlišnými spôsobmi (reakciou medzi TiCl_4 a butylalkoholom alebo n-butanolom) sú takmer rovnaké. Je viditeľné, že anatas a rutil sa nachádzajú v pásme nižších vlnových dĺžok (vyššie hodnoty eV) vďaka rozdielnym štruktúram pásov v spektre. FL spektrá TiO_2 častíc vo forme anatasu v tetrahydrofurane (THF) s excitáciou na 250 nm a 364 nm sú prezentované na Obr. 5. Emisia v spektrálnej oblasti sa objavuje od 326 nm do 400 nm s rozdelenými píkmi na 426 nm , 442 nm , 459 nm , 484 nm a 529 nm . Zmenou rozpúšťadla (xylén, metanol, voda) sa neznižuje intenzita alebo tvar, či už pozícia píku v spektre s porovnaním so spektrom anatasových TiO_2 častíc v THF [16].



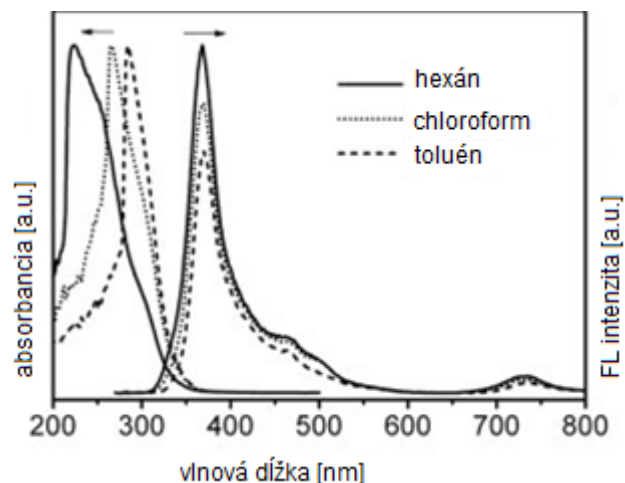
Obr. 5 FL spektrá koloidov pozostávajúcich z (a) anatasových TiO_2 častíc pripravených reakciou TiCl_4 a benzyl alkoholu, (b) anatasových TiO_2 častíc pripravených reakciou TiCl_4 a *n*-buthanolom (c) rutilových TiO_2 častíc pripravených pomocou hydrolyzy TiCl_4 [16].

V ďalšej štúdií boli skúmané TiO_2 nanočastice s priemerom 15 nm (Obr. 6). Intenzita fotoluminiscencie nanočastíc sa zvyšovala so znižujúcou sa teplotou. Aplikáciou nižšej teploty sa podarilo získať čistejšie emisné spektrá. Emisia kryštálov anatasu bola charakteristická v oblasti 364 nm. Pri teplote 300 K sú pozorované dva píky na 480 nm a 580 nm. Oba píky sa rozširujú vplyvom teploty 10 K a to viac u prvého, s vlnovou dĺžkou 480 nm. FL sa nevyskytuje v oblasti 300-430 nm. Emisia pri 480 nm môže byť pripísaná k prechodu náboja z Ti^{3+} na kyslíkový anión v zlúčenine TiO_6^{8-} . Nie je jasné, čomu prislúcha fotoluminiscencia objavujúca sa v pásme 580 nm [17].



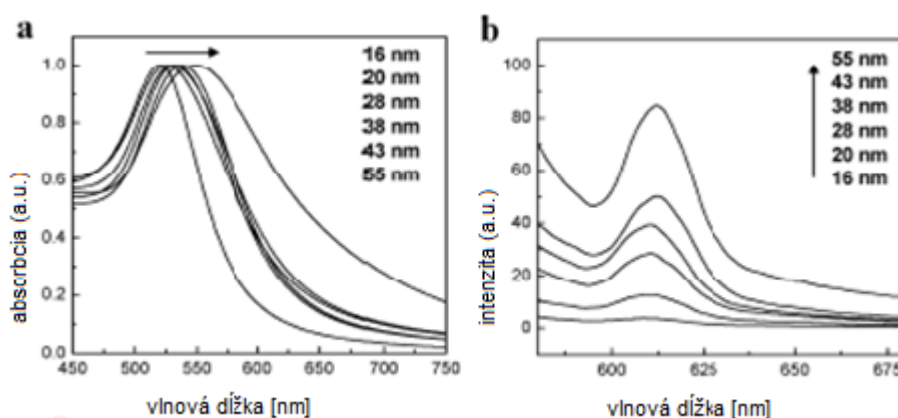
Obr. 6 FL spektrá merané pri 300 K (A) a 10 K (B). Excitačná vlnová dĺžka nastavená na 263 nm [17].

Pretože TiO_2 je nepriamy polovodič, luminiscencia nanokryštálov zakázaného pásu je veľmi ťažko pozorovateľná. Pravdepodobnosť emisie nepriameho prechodu je nižšia ako pri priamych prechodoch. Na druhej strane typický Bohrov polomer excitónu TiO_2 nanokryštálov je 1,5 nm. Obr. 7 ukazuje UV-VIS absorpciu a FL spektrum TiO_2 nanoštruktúr obalených kyselinou stearovou (SA) v hexáne, chloroforme a toluéne. Všetky spektrá takto vytvorených štruktúr sú si podobné. Pre luminiscenciu nanoštruktúr TiO_2 obalených v SA je dominantná luminiscencia v blízkosti zakázaného pásu nasledovaná slabou emisiou. Emisné spektrum pri excitácii 250 nm vykazuje 3 píky na 370, 465 a 732 nm. Emisné pásмо, ktoré sa nachádza na 370 nm s plnou šírkou v polovici maxima (FWHM) je okolo 35 nm. Emisia pri 465 nm súvisí s povrchovými stavmi, v dôsledku nekompletnej povrchovej pasivácie, kde sa objavuje rekombinácia. FL pík okolo 730 nm sa spája s prenosom elektrónov z vodivostného pásu do dier zachytených v intersticiálnych miestach s Ti^{3+} . Fluorescenčné spektrá boli merané s rozlíšením 1 nm. TiO_2 nanočastice boli žiahané na 180 °C po dobu 12 h. Analýza z TEMu ukazuje priemernú veľkosť nanočastice 4,5 nm a Ramanova spektroskopia potvrdzuje fázu anatasu [18].



Obr. 7 UV-VIS absorpcia a FL spektrum TiO_2 nanoštruktúr obalených kyselinou stearovou (SA) v hexáne, chloroforme a toluéne [18].

1.4.2 Fluorescencia zlatých nanočastíc



Obr. 8 Absorpčné (a) a fluorescenčné (b) spektrá zlatých koloidných nanočastíc [19].

Ren et. al. [19] skúmal absorpčné a fluorescenčné spektrá zlatých koloidných nanočastíc s priemerom 16, 20, 28, 38, 43 a 55 nm na fluorescenčnom spektrofotometri WGY-10 (Tianjin Gangdong Sci. & Tech. Development Co. Ltd., China). So zväčšujúcou sa veľkosťou nanočastíc sa absorpčné spektrá posúvajú do červenej oblasti. Fluorescenčné spektrá zostávajú takmer na konštantnej hodnote 610 nm s postupným zvyšovaním intenzity emisie, čo môže naznačovať vnútornú fluorescenciu zlatých nanočastíc. Excitačná vlnová dĺžka bola nastavená na 532 nm.

2 Metódy charakterizácie nanoštrukturovaných povrchov

2.1 Mikroskopické metódy

2.1.1 Skenovacia elektrónová mikroskopia

Skenovacia elektrónová mikroskopia (SEM) je metóda, ktorá sa využíva na zisťovanie fyzikálnych parametrov nanoštrukturovaných povrchov, ako sú napríklad rozmery nanoštruktúr, či ich usporiadanie (topografia). Taktiež nás informuje o prítomnosti defektov a nehomogenít. K tomuto účelu využívajú tzv. sekundárne (odrazené) elektróny, ktorých zdrojom je najčastejšie wolfrámové vlákno. Pri interakcií elektrónov so vzorkou vzniká rad ďalších signálov napr. Augerove elektróny, katódoluminiscencia a röntgenové žiarenie. Spolu nám poskytujú mnoho ďalších informácií, ako je prvkové zloženie preparátu [20].

SEM sa od transmisnej elektrónovej mikroskopie (TEM) líši už na prvý pohľad dĺžkou tubusu, pretože SEM neobsahuje sústavu šošoviek, ktorá tvorí u TEM zobrazovací systém v spodnej časti tubusu – signály sa detegujú pomocou primárneho zväzku elektrónov, ktoré sú uvoľnené nad povrch preparátu. Primárne elektróny urýchlené potenciálom medzi katódou a anódou prilietajú na sústavu elektromagnetických šošoviek. Tento lúč elektrónov je pred dopadom na povrch preparátu rozposybovaný vychyľovacími cievkami tak, že skenuje malú plochu. Obraz je teda vytvorený riadkovaním (rastrovaním) úzkeho lúča elektrónov po povrchu vzorky. Detektor sekundárnych elektrónov je prostredníkom medzi dejom odohrávajúcim sa pri interakcií primárnych elektrónov s povrchom preparátu, pri ktorom dochádza k uvoľneniu sekundárnych elektrónov a obrazovkou mikroskopu, na ktorú prenáša informácie získané zachytením sekundárnych elektrónov o topografickom kontraste preparátu. Detektor sekundárnych elektrónov je tvorený scintilátorom, ktorý po dopade elektrónu uvoľňuje záblesk svetla, ktorého intenzita je priamo úmerná elektrónom, ktoré ho vyvolali. Mimo vákuum je umiestnený fotonásobič, ktorý zosilňuje signál [20].

Aby sa dosiahli kvalitné výsledky a vôbec úspešná rastovacia mikroskopia, je treba zabezpečiť dokonalý preparát, čistotu mikroskopu a dostatočné vákuum. Preparát

musí byť suchý, vodivý, mechanicky pevný a stabilný, nesmie byť poškodený. Na nevodivých preparátoch sa v SEM množí záporný elektrický náboj. Jeho elektrické pole pôsobí rušivo na obraz, ktorý sa všelijako deformuje a stráca kontrast. Aby k daným javom nedochádzalo, ich povrch sa pokrýva veľmi tenkou (20-30 nm) vrstvou kovu [20].

2.1.2 Röntgenová fotoelektrónová spektroskopia

Röntgenová fotoelektrónová spektroskopia (XPS) využíva fotoionizáciu a analýzu distribúcie kinetickej energie emitovaných fotoelektrónov za účelom skúmať zloženie a elektronický stav povrchovej vrstvy vzorky. V prípade XPS sa používa mäkké röntgenové žiarenie (s fotónovou energiou 200-2000 eV) na skúmanie jadrovej úrovne. Táto metóda patrí medzi dôležité nástroje nevyhnutné pre porozumenie rôznych typov povrchov, nanoštruktúrovaných, prírodných či syntetických. Metóda XPS poskytuje informácie o distribúcií štruktúr na vzorke, ich hrúbke, povrchovej funkcionalite a to všetko aj v škále nanorozmerov. Fotoelektrónová spektroskopia je založená na jednofotónovom procese, ktorá používa monochromatický zdroj žiarenia. V XPS je fotón absorbovaný atómom v molekule alebo látke, čo vedie k ionizácii a emisie jadra (vnútornej vrstvy) elektrónu. Distribúcia kinetickej energie emitovaných fotoelektrónov (tj. množstvo emitovaných fotoelektrónov ako funkcie ich kinetickej energie), môže byť meraná za použitia akejkoľvek vhodnej energie elektrónov a fotoelektrónové spektrum tak môže byť zaznamenané. Prítomnosť píkov pri jednotlivých zdrojoch energie indikuje prítomnosť určitého prvku vo vzorke - okrem toho intenzita píku úzko súvisí s koncentráciou prvku v pozorovanej oblasti. [21, 22]

2.1.3 Transmisná elektrónová mikroskopia

Táto moderná metóda umožňuje nielen manipulovať s nano-objektami s presnosťou na nanorozmery, ale taktiež poskytuje hlboký pohľad na ich fyzické a chemické vlastnosti. Transmisná elektrónová mikroskopia (TEM) umožňuje zobrazit' mikroštruktúry vo vnútri materiálov od niekoľko mikrometrov až po atómové rozlíšenie. Vzorky pre TEM musia byť dostatočne malé (3 mm v priemere a tenšie než 0,5 μm), aby nimi mohli prejsť elektróny. Dá sa povedať, že TEM pracuje na princípe svetelného mikroskopu. Namiesto svetelného zdroja sa však používa elektrónové delo, ktoré emituje elektróny. Tento elektrónový zdroj poskytuje koherentný zväzok elektrónov – elektróny vychádzajú z bodového zdroja s rovnakou energiou a ich sprievodná vlna by mala mať rovnakú fázu. Elektrónové delo tvorí katóda (wolfrámové vlákno žhavené na teplotu 2800 °C; v súčasnej dobe je používanější elektrónová

tryska) a anóda s kruhovým otvorom v strede, ktorá priťahuje elektróny a dáva im dostatočné zrýchlenie. Elektromagnetická šošovka nahradzuje sklenenú a ako okulár sa používa fluorescenčné tienidlo. U elektromagnetickej šošovky sa zmenou prúdu mení jej ohnisková vzdialenosť. Elektrónové delo, šošovka a aj tienidlo sa musia nachádzať vo vákuu, aby nedošlo k absorpcii elektrónov alebo ku kontaminácii tubusu a vzorku. Výsledný obraz sa zobrazuje na fluorescenčnom tienidle v projekčnej komore. Zobrazovaciu sústavu tvorí držiak preparátu, objektív, medzišošovky, projektívy a fluorescenčné tienidlo. Preparát sa v mikroskope umiestňuje do tesnej blízkosti pólových nástavcov objektívu. Pod preparát sa inštaluje objektívová clona, čím sa zvyšuje kontrast výsledného obrazu. Obraz vytvorený objektívovou šošovkou sa ďalej zväčšuje na požadovanú veľkosť pomocou projektívy a intermediálnych šošoviek. Aby bolo možné vidieť elektróny, ktoré prešli preparátom a zobrazovacím systémom, je potrebné preniesť informácie, ktoré nesú do oblasti viditeľného svetla. K tomuto účelu sa na dno umiestňuje tienidlo najčastejšie pokryté ZnS. Výstup z TEM tvorí trvalý záznam snímku zaznamenaný na špeciálny fotografický materiál, alebo digitálne pomocou CCD kamier [23, 24].

2.2 Spektroskopické metódy

2.2.1 Energiovo disperzná röntgenová spektroskopia

Energiovo disperzná röntgenová spektroskopia (EDX) je mikroanalytická metóda, ktorá poskytuje kvantitatívne a kvalitatívne informácie o chemickom zložení vzorku pre prvky s protónovým číslom väčším ako tri. EDX využíva röntgenové spektrum vyžarované pevnou látkou bombardovanou zaostreným lúčom elektrónov na získanie lokalizovanej chemickej analýzy. Všetky prvky od protónového čísla 4 (Be) do 92(U) môžu byť detekovateľné, aj keď nie všetky prístroje sú citlivé pre „ľahké“ prvky ($Z < 10$). Kvalitatívna analýza zahŕňa identifikáciu čiar v spektre a je pomerne jednoduchá oproti RTG spektru. Kvantitatívna analýza (stanovenie koncentrácie z prítomných prvkov) zahŕňa meranie intenzity pre každý prvok vo vzorke a pre rovnaké prvky v kalibračných štandardoch známeho zloženia [25].

2.2.2 Fluorescenčná korelačná spektroskopia

Fluorescenčná korelačná spektroskopia (FCS) je jednou z metód, ktorá umožňuje vysoko rozlíšiteľnú priestorovú a časovú analýzu vzoriek o extrémne nízkych koncentráciách. S porovnaním s ostatnými fluorescenčnými technikami predmetom záujmu nie je intenzita emisie, ale spontánne kolísanie intenzity spôsobené odchýlkami

subsystémov od tepelnej rovnováhy. Je teda založená na sledovaní kolísania intenzity fluorescencie, ktorá pochádza z látok difundujúcich cez veľmi malý pozorovaný objem. Dá sa povedať, že všetky fyzikálne parametre, ktoré vedú ku kolísaniu fluorescenčného signálu sú dostupné pomocou FCS. Touto metódou môžeme ľahko určiť koncentráciu, molekulárny jas, difúzne koeficienty alebo charakteristický stupeň konštánt z intramolekulárnych reakcií fluorescenčne značených molekúl v nanomolárnych koncentráciách. Časové fluktuácie intenzity fluorescencie sú zaznamenávané a analyzované pomocou autokorelačnej funkcie (ACF) $G(\tau)$. Získané difúzne časy súvisia s ich difúznym koeficientom D . Existujú rôzne prístupy ako získať výsledné hodnoty pomocou FCS. Pri časovo rozlíšenej FCS sa ACF vypočíta z rôznych časov príchodov detegovaných fotónov na detektor. Ak vzorka obsahuje viacej difundujúcich fluoroforov, prispievajú všetky k zisteným fluktuáciám intenzity a výsledná ACF je získaná superpozíciou jednotlivých difundujúcich rozlíšiteľných príspevkov. Predmetom dvojfokusovej FCS je meranie absolútnej hodnoty difúzných koeficientov, pričom sa nevyžaduje prítomnosť kalibračného vzorku [26, 27].

3 Modifikácie, funkcionalizácie a biomedicínske aplikácie nanoštruktúr

3.1 Modifikácia nanoštruktúr

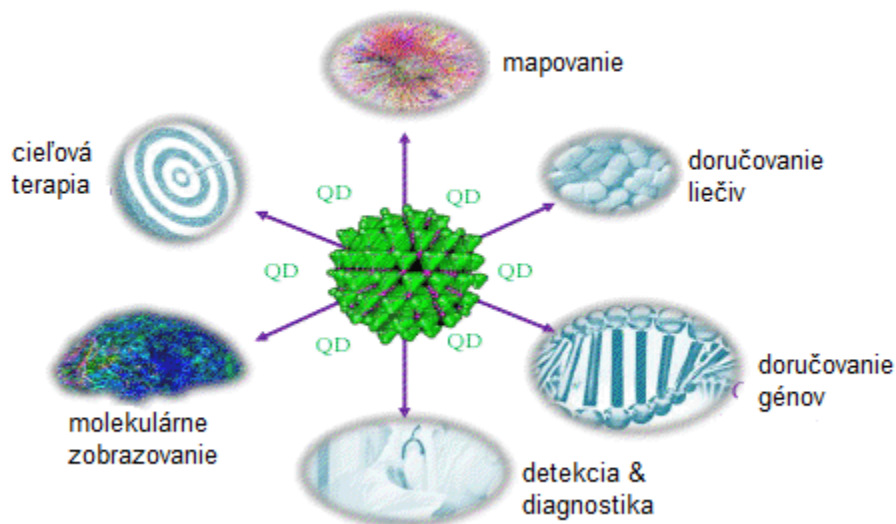
Povrch QDs je vhodné modifikovať tak, aby bolo možné na ne naviazať určitú bioaktívnu látku (napr. protilátky, receptory, atď.), ktoré umožnia špecifické zachytenie detegovanej biomolekuly, alebo bunkovej štruktúry. K modifikácii QDs fixovaných na pevných látkach sa často využíva zlatá vrstva pripravená pomocou naparenia, alebo elektrochemických metód. Zlato sa široko používa v mnohých aplikáciách vďaka jeho biokompatibilite, pretože vytvára silnú kovalentnú väzbu s alkánthiolovými (-SH) skupinami. Vďaka -SH skupine môžu teda zlaté nanočastice na svoj povrch viazať takmer všetky typy chemicky a biologicky aktívnych molekúl. Znamená to, že funkčná aktivita týchto molekúl zostáva nedotknutá, aj po ich mobilizácii na zlaté nanočastice (GNPs) [28]. Pretože tieto nanočastice majú veľký pomer objemu a povrchovej plochy, poskytujú excelentnú ukážku ako imobilizovať veľké kvantum biomolekúl, čím vzrastajú šance ich interakcie s cieľovým analytom. Ďalšou prednosťou je, že väčšinou majú negatívny náboj, čo umožňuje elektrostatické interakcie s konkrétnymi kladne nabitými biomolekulami. Okrem toho biofunkcionalizované GNPs majú výhodu multiplexingu v detekcii analytov. Pri tomto procese, GNPs hostia niekoľko ligandov, ktoré môžu interagovať s viacerými receptormi, a tak je možné detegovať viacero cieľových analytov v rovnakom čase [29].

3.2 Funkcionalizácia nanoštruktúr

Funkcionalizácia predstavuje kľúčový krok v syntéze nanoštruktúr a nanočastíc. Jedná sa o obalenie nanoštruktúry takou biomolekulou, ktorá obsahuje funkčnú skupinu s veľkou afinitou k ďalším látkam, ktoré sa následne viažu na funkcionalizovaný povrch nanoštruktúry. Napríklad nanočastice modifikované zlatom a funkcionalizované streptavidínom vykazujú afinitu k biotínu, vďaka silným elektrostatickým interakciám. Na látku ktorá sa deteguje sa najskôr naviaže biotín pomocou NH_2 skupiny. Povrch QDs so zlatom modifikovaným streptavidínom sa nakoniec nechá „reagovať“ s biotinylovaným analytom [29].

3.3 Biomedicínske aplikácie nanoštruktúr

Väčšina kvantových bodiek je toxických, čo znamená určité nebezpečenstvo pre ich použitie v medicínskych aplikáciách. Odstránenie toxicity teda znamená kľúčový faktor pre ďalší výskum. Vedci zistili, že existuje mnoho spôsobov ako sa to dá docieľiť. Napríklad použitím glutathionu, ktorý môže byť aplikovaný na detoxikáciu Cd^{2+} iónov, vďaka jeho chelačným účinkom. Inými slovami povrchová funkcionalizácia QDs hrá pri toxicite veľkú rolu. Absorpcia, distribúcia, metabolizmus a toxicita QDs závisí na rôznych faktoroch odvodených od fyzikálno-chemických vlastností a prirodzených podmienok ako sú veľkosť, náboj, koncentrácia, bioaktivita, oxidatívna, mechanická a fotolytická stabilita. QDs sú excelentnými kandidátmi pre biozobrazovanie, pričom umožňujú naviazanie rôznych biomolekúl na ich povrch. Ako hovorí Obr. 9 používajú sa pri biozobrazovaní, doručovaní génov a liekov atď.[10].



Obr. 9 QDs a ich rôzne biomedicínske aplikácie.

Zlaté nanočastice predstavujú novú triedu univerzálnych fluorescenčných zhášačov, ktoré nájdu uplatnenie vo vývoji biosenzorov a molekulárneho inžinierstva. Merkoci et al. [30] skúmal vplyv GNPs na zhášanie fluoroforov pri detekcii DNA. V prípade DNA sond sa thiol sa naväzuje na jednom konci a farbivo na druhom. Bolo zistené, že DNA molekuly sa cez thiol naviažu na povrch GNP a tam sa organizujú do obmedzenej konformácie. Fluorofor je kompletne zhášaný nanočasticou. Po cieleťom naviazaní DNA sa obmedzená konformácia otvorí a spôsobí, že fluorofor je od povrchu

nanočastice vzdialený cca 10 nm. Táto štrukturálna zmena produkuje fluorescenčný signál, ktorý je vysoko senzitívny a špecifický pre vlákno DNA.

Podobne ako sa u zlatých nanočastíc objavuje fluorescenčné zháňanie, predpokladáme, že aj u TiO₂ QDs modifikovaných zlatou vrstvičkou bude prítomné.

GNPs sú vhodné k doručovaniu liečiv do rôznych častí bunky vďaka ich ľahkej syntéze, funkcionalizácii a biokompatibilite. GNPs funkcionalizované špecifickými molekulami môžu efektívne zničiť nádorové bunky alebo baktérie. Prenos molekúl liečiv je zabezpečený vďaka veľkej povrchovej ploche GNPs. GNPs sa používajú pri podávaní bielkovinových liečiv, lebo sú schopné prechádzať cez bunkovú membránu, čo umožňuje práve interakcia zlatých nanočastíc a bunkových lipidov. Podobne aj GNPs kovalentne viazané na nízko molekulárny chitosan môžu zvyšovať účinnosť na doručovanie vakcín [31, 32]. Tieto Chito6-GNPs boli študované kvôli ich účinnosti in vitro a in vivo. Keď sú vpravené intramuskulárne do BALB/c myši, konjugáty vykazujú väčšiu účinnosť ako obyčajná DNA vakcína. Konjugáty chito6-GNP taktiež indukujú cytotoxicitu odpovedí T-lymfocytov na nízku dávku v porovnaní k obyčajnej DNA [1].

GNPs sú taktiež používané v kombinácii s magnetickými nanočasticami, ktoré sa používajú na účinné zobrazovanie nádorových buniek [33]. Nanočastice môžu označovať nádorové bunky pomocou akumulčných a zadržiavacích procesov spôsobených angiogenezou ciev a nesprávnym lymfatickým obehom. Z toho dôvodu sa môžu nanočastice hromadiť selektívne vo vnútri nádorových buniek vo vyššej koncentrácii ako u normálnych buniek [1].

GNPs funkcionalizované s fluorescenčne značeným heparínom boli použité na cielenú detekciu a na apoptickú smrť nádorových buniek. Dôvodom tejto štúdie je nadmerná expresia enzýmov odbúravajúcich heparín pomocou metastatických rakovinových buniek [1].

3.3.1 PEGylácia/Polyetylénglykolizácia

PEGylácia je jedna z používaných metód pre funkcionalizáciu zlatých nanočastíc. Princíp spočíva v naviazaní PEG (polyetylénglykol) na GNPs a to samotného alebo v spojení ešte s inou molekulou ako je biotín, bielkoviny alebo oligonukleotidy, ktoré pomáhajú GNPs dostať sa k cieľovým bunkám. Vďaka ich schopnosti viazať sa k bunkovej membráne môže takáto funkcionalizácia slúžiť ako prenášač liečiv.

PEGylácia GNPs je užitočná v bunkovom a vnútrobunkovom označovaní biologických štruktúr. Syntetizujú sa aj takzvané hetero-bifunkcionálne PEG GNPs kde je GNPs z jednej strany funkcionalizovaná tiolovou skupinou a z druhej fluorescenčným farbivom. Vďaka tomuto farbivu môžeme sledovať cestu ako sa GNPs dostávajú do bunky a ďalej v nej pohybujú. Stabilita a funkčná integrita PEGovaných GNPs je ovplyvnená faktormi ako molekulárna hmotnosť PEG, pripojenými funkčnými skupinami, ligandami a rozmerom použitých GNPs [1].

3.3.2 Konjugácia bielkovín / aminokyselín

Funkcionalizácia nanočastíc aminokyselinami a bielkovinami je efektívny spôsob ako zvýšiť špecifitu a účinnosť nanočastíc, ktoré fungujú ako nosiče/prenášače. Zistilo sa, že GNPs funkcionalizované aminokyselinami ako je lyzín, polylyzín a glycín viažu DNA s vyššou účinnosťou a fungujú ako netoxický doručovatelia génov. Primárne aminy aminokyselín prispievajú k vyššej väzbovosti kationových skupín na DNA. GNPs funkcionalizované bielkovinami sú využívané ako efektívne prostriedky na označovanie buniek. Na označovanie vnútrobunkových štruktúr sa používajú GNPs funkcionalizované bielkovinou CALNN a jej derivátom CALNNR₈ [34]. Distribúcia takejto funkcionalizovanej GNPs (fGNPs) je závislá na koncentrácii peptidu a taktiež na veľkosti GNPs. Zistilo sa, že GNPs s veľkosťou 30 nm sú schopné prechádzať bunkovou membránou pomocou endocytózy a mikropinocytózy a taktiež vykazujú v bunke vyššiu afinitu k DNA, RNA, a endoplazmatickému retikulu (ER). Keď oba zmiešané peptidy CALNN a CLANNR₈ prechádzajú k jadru, CLANNR₈ je zadržiavaný endoplazmatickým retikulom vďaka vyššej afinite ER pre signálne peptidy bohaté na arginín. S konštantným priemerom nanočastíc a so zvyšujúcou sa hustotou peptidov sa teda presun bunkou mení z jadra do endoplazmatickeho retikula, kde je hustota peptidov konštantná oproti priemeru nanočastíc. Životaschopnosť bunky môže byť z časti pripísaná k internalizácii fGNP [1].

GNPs funkcionalizované bielkovinami sú taktiež známe ako aktivátory makrofágov, čo ich robí perspektívnymi v očkovaní, kde slúžia ako pomocné látky. Je to možné vďaka ich schopnosti viazať rozličné biomolekuly a zároveň exponovať menšie molekuly imunitnému systému, ktoré sú inak makrofágmi nerozpoznané [1].

3.3.3 Nanočastice funkcionalizované oligonukleotidmi

Konjugované DNA nanoštruktúry môžu byť syntetizované spôsobom, že sa buď pripojí určitý počet jednovláknovej DNA molekuly na GNPs cez tiolové skupiny,

alebo GNPs len saturuje svoj povrch jednovláknovou molekulou. Nanokonjugáty funkcionalizované oligonukleotidmi sú pripravované zmiešaním alkántiol-ukončenými oligonukleotidmi a GNPs obalenými citrátom. Oligonukleotidy nahradzujú citrát na GNPs cez väzbu Au-thiol. NaCl sa pridáva do reakčnej zmesi, čo umožňuje väčší počet oligonukleotidov chemicky sa adsorbovať na povrch nanočastice, čoho výsledkom je hustá vrstva oligonukleotidov. Na plochu GNPs o priemere 15 nm sa môže adsorbovať asi 250 oligonukleotidov a tak vytvoriť širokospektrálnu štruktúru [1].

Konjugácia aptamer-GNP je využívaná na označenie buniek karcinómu prostaty. Princíp spočíva v pripojení GNPs s oligonukleotidmi komplementárnymi k sekvenciám anti-PSMA (prostate specific membrane antigen), čím sa uľahčí pripevnenie PSMA-GNPs na protilátku anti-PSMA. Tieto výsledky ukazujú sľubnú rolu fGNPs v detekcií a zobrazovaní rakovinových buniek [1].

3.3.4 Protilátky

Zlaté nanokonjugáty značené protilátkami sa v imunohistochemii používajú takmer 40 rokov. Avšak v poslednej dobe došlo k obnoveniu ich používania v spojení ich štúdiá so živými bunkami. Protilátky sa môžu adsorbovať na GNPs cez hydrofóbnú a iónovú väzbu, alebo prostredníctvom chemisorpcie natívnych thiolových skupín prítomných v ich chemickej štruktúre. Na zobrazovanie rakovinových buniek boli použité GNPs modifikované protilátkami so špecifickými rakovínovými proteínmi. V jednom prípade boli inkubované konjugáty s protilátkami na epiteliálny receptor rastového faktoru (z angl. epithelial growth factor receptor, EGFR) s nádorovými a nenádorovými epiteliálnymi bunkami. Výsledok svetelnej mikroskopie ukázal, že konjugáty viazané na nádorové bunky majú 6-krát väčšiu afinitu ako tie, ktoré sú viazané na nenádorové. Tento objav môže byť potenciálne úspešný pre detekciu nádorových buniek [35].

3.3.5 Thymopoietín II peptide fragment

Thymopoietín je typ génu, ktorý kóduje proteíny. Proteín kódovaný týmto génom je umiestnený v jadre a môže hrať úlohu v zostave jadrovej laminy, čím pomáha udržiavať štrukturálnu organizáciu jadrového obalu. Môže slúžiť ako receptor pre upevnenie vlákien lamín na vnútornej strane jadrovej membrány. Mutácie v tomto gène sú spojené s dilatálnou kardiomyopatiou [36].

4 Experimentálna časť

Experimentálna časť je zameraná na výrobu, modifikáciu, charakterizáciu fyzikálnych vlastností a funkcionalizáciu pripravených TiO_2 kvantových bodiek so zlatou vrstvičkou, molekulou redukovaného glutathionu (GSH) a thymopietinu. Následne sú pomocou fluorescenčnej spektroskopie vyhodnocované emisné spektrá.

4.1 Použité chemikálie

- kyselina sírová v koncentrácií 1-3 mol/l
- zlatiaci elektrolyt: 0,6g $\text{K}[\text{Au}(\text{CN})_2]$ + 0,232g H_3BO_3 , doplnený Millipore vodou na 100 ml
- leptadlo: 10 ml H_3PO_4 + 3 g CrO_3 , doplnené Millipore vodou na 100 ml

4.2 Použité prístroje

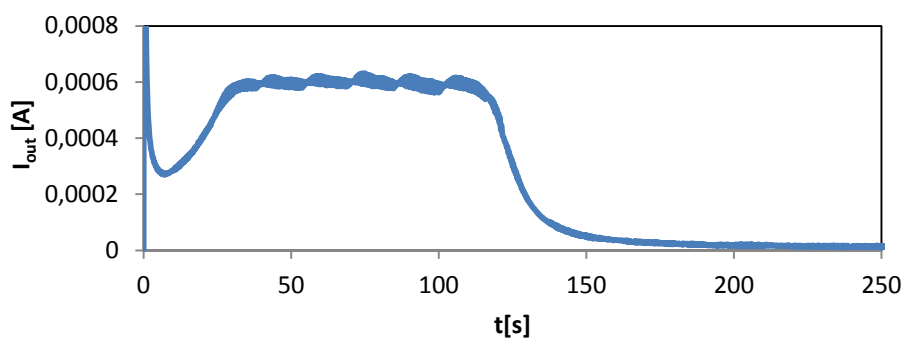
- naparovačka Tesla Opočno
- zdroj napätia Agilent 6645A
- multimeter Agilent 34970A
- čerpadlo STEPDOS 085
- chladiaci systém Thermo HAAKE DC 30; Thermo HAAKE K10
- PC

4.3 Príprava vrstvy titánu a hliníka

V tejto práci bola použitá dvojvrstva Ti/Al nanosená na kremíkovom waferi s hrúbkou $\text{Ti} \approx 50$ nm a $\text{Al} \approx 100$ nm. Obe vrstvy boli vytvorené pomocou naparovania, ktoré prebiehalo na naparovačke U311B Tesla Opočno. Hliník bol odparovaný z wolfrámového drôtového odparovadla pri tlaku $2,1 \cdot 10^{-4}$ Pa.

4.4 Príprava TiO₂ kvantových bodiek

Kvantové bodky boli vyrobené v procese jednokrokovej anodickej oxidácie. Výroba nanoštruktúr prebiehala tak, že na wafer, umiestnený v anodizačnej aparátúre bola priložená vodotesná hlavica, do ktorej prúdil elektrolyt za pomoci čerpadla. Ako elektrolyt bola použitá 3 M H₂SO₄ vychladená na 10 °C. V PC bolo nastavené napätie podľa toho, aká veľkosť nanobodiek bola potrebná a spustené meranie anodizačnej krivky, aby bol zachytený priebeh výroby nanoštruktúr. Anodizačná krivka je zobrazená na Obr. 10. Pokles výstupného prúdu na hodnotu rádovo 10⁻⁵-10⁻⁶ A indikuje oxidáciu Ti vrstvy, a tak tvorbu TiO₂ nanobodiek. Nanoštruktúry boli vyrobené pri napätí 20 V, 10 V a 5 V. Po dokončení anodizácie, ktorá trvala približne 10 minút boli vzorky opláchnuté pod destilovanou vodou. Následne bola odleptaná Al₂O₃ maska pomocou leptadla o teplote 60 °C po dobu 10 min.



Obr. 10 Ukážka anodizačnej krivky vzorku vyrobeného za podmienok: 5 V; 3 M H₂SO₄; 10 °C.

4.5 Modifikácia TiO₂ kvantových bodiek zlatom

Modifikácia TiO₂ QDs zlatom bola uskutočnená v procese pulznej depozície s rôznou prúdovou hustotou a rôznym počtom pulzov. Pulzná depozícia zlata prebiehala v aparátúre na anodickú oxidáciu, avšak namiesto oxidácie dochádzalo k redukciám. K modifikácii TiO₂ QDs bol použitý zlatiaci elektrolyt o teplote 60 °C pripravený z 0,6 g K[Au(CN)₂] a 0,232 g H₃BO₃ v 100 ml Millipore vody. Zlatiaci elektrolyt bol deponovaný na nanočastice s Al₂O₃ maskou, ktorá bola následne odleptaná leptadlom o teplote 60 °C po dobu 10 minút.

4.6 Proces žihania

Vzorky boli žíhané v peci na vzduchu pri 800 °C a v peci vo vákuu na 600 °C (VAKUUM PRAHA) po dobu 1 h za účelom transformácie amorfneho TiO_2 na kryštalickú fázu, najlepšie anatas. Kryštalická štruktúra je nevyhnutná pre dosiahnutie požadovaných fluorescenčných vlastností.

4.7 Príprava roztoku, biofunkcionalizácia

Ako modelová látka pre štúdium biofunkcionalizácie TiO_2/Au QDs bol vybraný Thymopoietín II peptidový fragment (získaný zo Sigma-Aldrich). V meraní fluorescenčného zhášania nanočastíc bola použitá koncentrácia thymopoiétinu 0,1 mg/ml v množstve 18 μl . Po aplikácii biomolekúl boli vzorky vysušené v peci na 60 °C po dobu 30 minút.

4.8 Charakterizácia pomocou SEM

Pripravené QDs na kremíkovom waferi a rovnako tak samotné kovové vrstvy (Ti a Al) boli charakterizované pomocou SEM Mira II MLU (Tescan) pri zväčšení 10,00 kx-400,00 kx pri móde vysokého vákuu – tlak rádovo 10^{-3} Pa a napätia 15 kV. Pracovná vzdialenosť bola nastavená na 1, 4-4,5 mm.

4.9 Fluorescenčná charakterizácia

Fluorescenčné meranie sa môže prevádzať dvomi spôsobmi - v časovom rozlíšení alebo spôsobom steady state (ustálená fluorescencia). Vzorky boli detegované pomocou prístroja Fluorolog (Horiba, Jobin-Yvon), ktorý prevádza práve steady-state meranie. Prístroj umožňuje stanovenie excitačných a emisných, 3D a synchrónnych spektier. Taktiež umožňuje stanoviť dobu života od stoviek pikosekúnd do desiatok sekúnd. Meranie je možné uskutočniť v polarizovanom svetle a pri rôznych teplotách od -10 °C do 100 °C a pri teplote kvapalného dusíka. Prístroj poskytuje stacionárnu a polarizovanú fluorescenciu. Ustálená fluorescencia sa meria pri budení kontinuálnym žiarením a výsledkom je časová stredná hodnota intenzity či polarizácie fluorescencie. Polarizovaná fluorescencia je charakteristická svojou fotoselekciou, ktorá vzniká ak je vzorka fluoroforov excitovaná lineárne polarizovaným žiarením. Vtedy dochádza k excitácii iba tých molekúl, ktoré majú nenulový priemer svojho absorpčného prechodového momentu do smeru polarizácie. Ak je priemerný rotačný relaxačný čas (charakterizujúci rotačnú difúziu v roztokoch) omnoho dlhší než čas dohasínania

fluorescencie, potom výsledná fluorescencia bude taktiež polarizovaná. Ak je však tento relaxačný čas menší než čas dohasínania, potom anizotropia systému klesne ešte pred emisiou na limitnú hodnotu. Pokiaľ budú fluorescencia a rýchlosť molekulárnej reorientácie porovnateľné, potom bude polarizácia fluorescencie modulovaná molekulárnym pohybom a analýza časovej závislosti emisnej anizotropie bude poskytovať informáciu o anizotropii systému, v ktorom sa fluorofor nachádza. Meranie polarizácie fluorescencie poskytuje informácie o molekulárnej orientácii, pohyblivosti a procesoch, ktoré ju modulujú [37, 38]

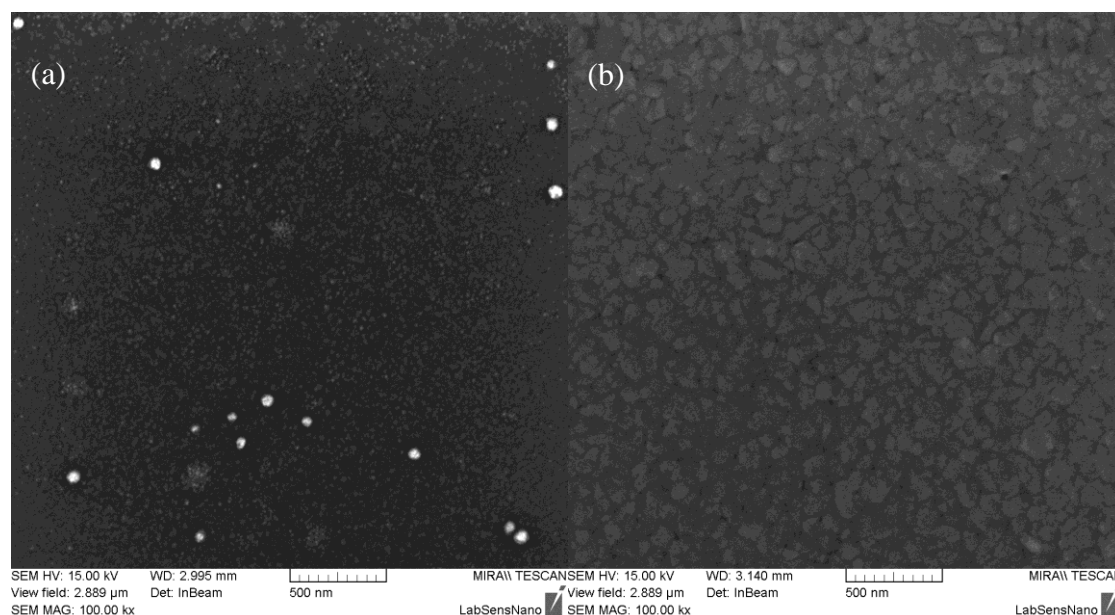
V tejto práci boli emisné spektrá získané pri excitácii 350 nm, ale aj v rozsahu excitačných vlnových dĺžok od 260 do 410 nm s krokováním po 10 nm. Šírka štrbín bola nastavená na 5 mm a polarizátory na 90°. K detekcii emitovaného žiarenia v rozsahu 360-680 nm bol použitý fotonásobič (T1 PMT) a dvojité monochromátor. Uhol, ktorý zvieral lúč s rovinou detektoru mal hodnotu 35°. Ako zdroj excitačného žiarenia bola použitá xenónová výbojka.

5 Výsledky a diskusia

5.1 Charakterizácia vzoriek pomocou SEM

V nasledujúcich podkapitolách sú uvedené vrstvy nasnímané pomocou SEM, ktoré boli použité na prípravu nanoštruktúr a jednotlivé snímky samotných nanoštruktúr pripravených pri rôznych hodnotách napätia. Experimentálne sa zistilo, že vplyvom nižšieho anodizačného napätia vznikajú TiO_2 nanoštruktúry menších rozmerov a vplyvom priloženého vyššieho napätia zase nanoštruktúry väčších rozmerov. Z hľadiska modifikácie TiO_2 nanobodiek zlatom určuje prúdová hustota homogenitu pokrytia nanoštruktúr zlatou vrstvou. Vplyvom nižšieho anodizačného napätia (5 V) vznikajú TiO_2 nanoštruktúry s priemerom v rozmedzí 10-15 nm. Depozíciou zlata ich veľkosť vzrastie na 15-20 nm. Teoreticky by malo platiť, že vplyvom menšieho počtu pulzov o dlhšom trvaní vzniknú nanoštruktúry s kvalitnejším homogénnejším pokrytím [2, 39]. Taktiež menšie nanoštruktúry by mali vykazovať silnejšiu emisiu žiarenia vďaka kvantovému efektu [10].

5.1.1 Charakterizácia vrstiev titánu a hliníka

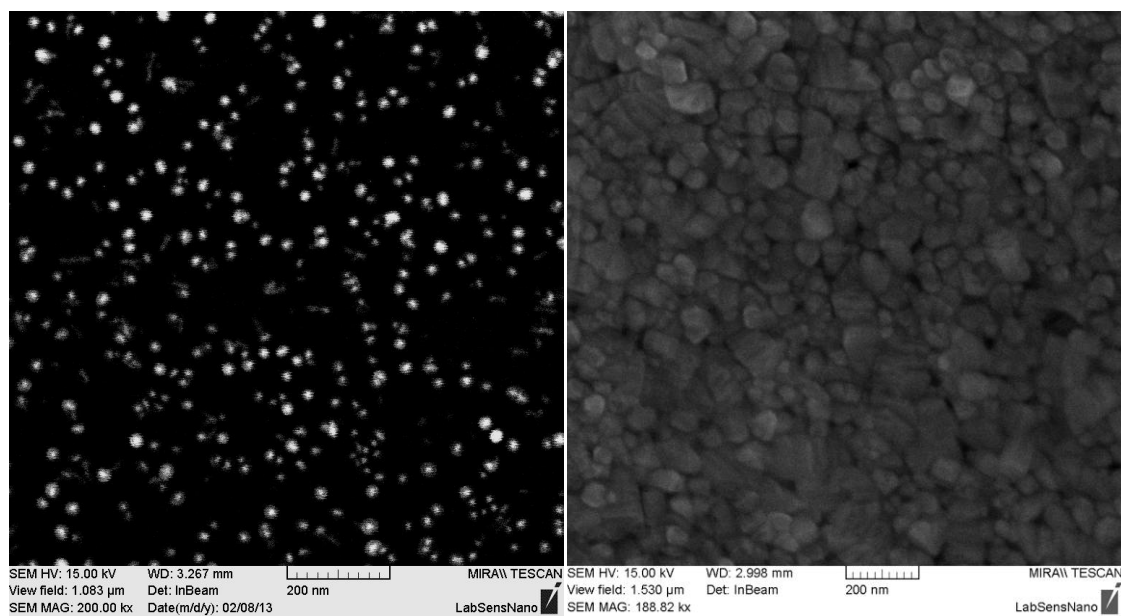


Obr. 11 Ukážka štruktúry povrchu titánu (a) a hliníka (b) zachyteného pomocou SEM.

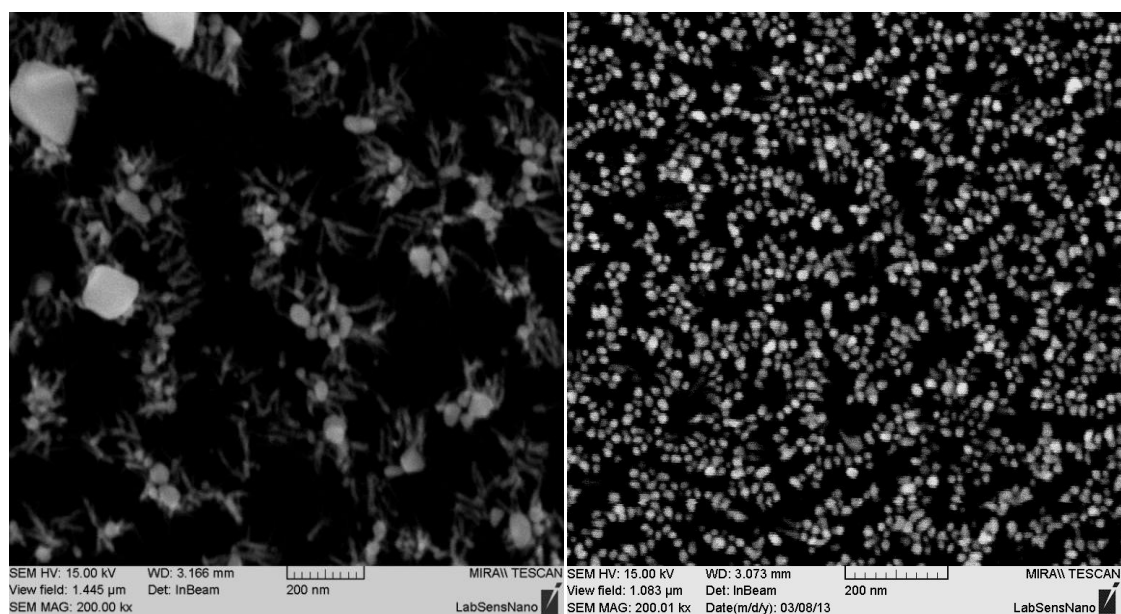
Oba obrázky sú zachytené pri rozlíšení 100 kx v merítke 500 nm. Na obrázku (a) je možno vidieť hladší povrch titánu so svetlými štruktúrami, ktoré by mali prislúchať nečistotám resp. prachovým časticiam. Obrázok (b) ukazuje povrch hliníka s väčšími zrnami oproti titánu (a).

5.1.2 Charakterizácia TiO_2/Au nanoštruktúr vyrobených pri podmienkach: 5V; 3 M H_2SO_4 ; 10 °C

Na priložených obrázkoch sa nachádzajú nanoštruktúry nasnímané pri rozlíšení 100 kx nm v merítke 200 nm. Na Obr. 12Obr. 13 sa nachádzajú Au/TiO_2 nanobodky s miestami popadanými tyčinkami. Vpravo sa nachádzajú čisté TiO_2 nanoštruktúry v kryštalografickej fáze rutil, ktorá vznikla vplyvom žihania pri teplote 800 °C. Na Obr. 13 sú zachytené nanoštruktúry vytvorené za rovnakých podmienok pulznej depozície zlata - počet pulzov: 15, veľkosť prúdu: 3 mA, dĺžka pulzov: 100 ms, dĺžka periódy medzi jednotlivými pulzami: 1s, (15x3mA 100ms 1s). Vpravo sa nachádza homogénne pokrytie Au nanobodiek, ktoré miestami prerastajú do nanotyčínok. Vľavo je vidieť slabé pokrytie nanotyčínok, s miestami predeponovaným zlatom.

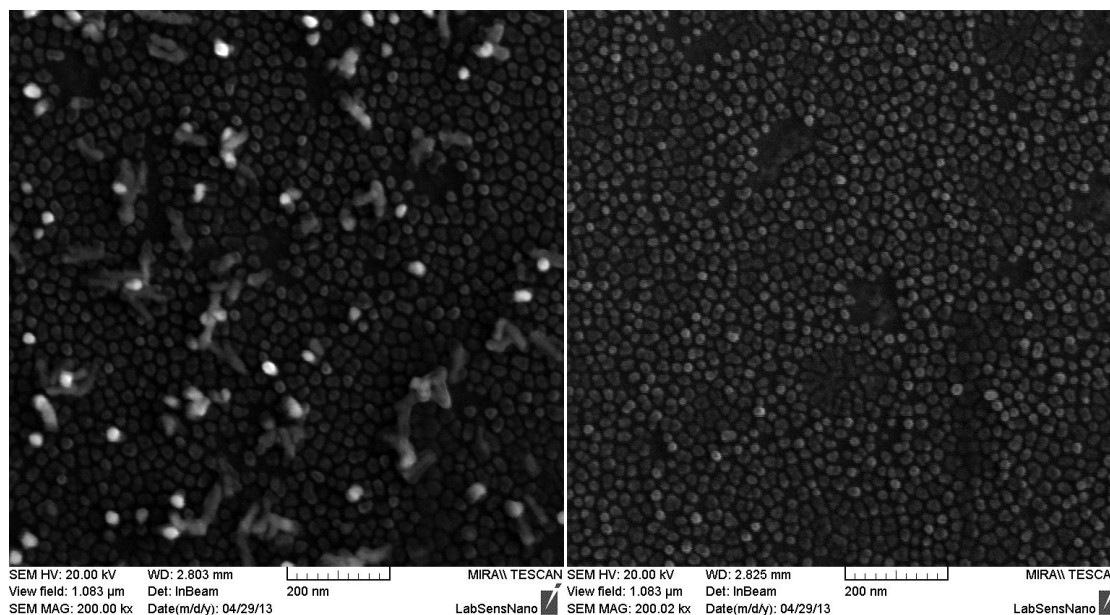


Obr. 12 Nanoštruktúry zachytené pomocou SEM: vľavo TiO_2 nanobodky so zlatom deponovaným za podmienok 3x5 mA 200 ms 200 ms. Vpravo TiO_2 bez zlata žihané na 800 °C.



Obr. 13 TiO_2 nanoštruktúry zachytené pomocou SEM, vytvorené za podmienok depozície zlata: 15x3 mA 100 ms 1 s.

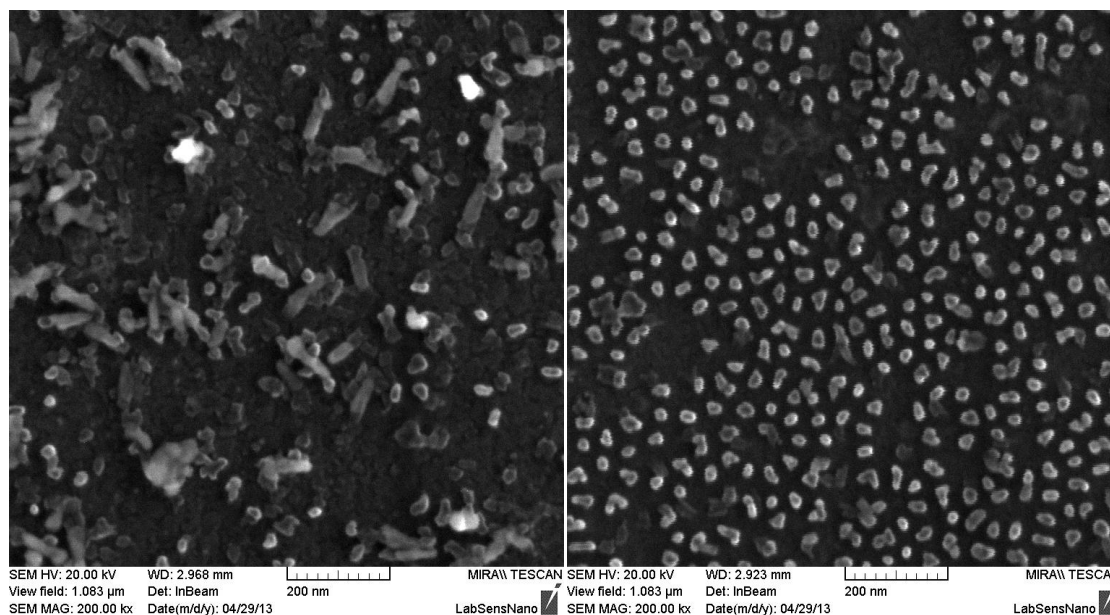
5.1.3 Charakterizácia TiO₂/Au nanoštruktúr vyrobených pri podmienkach: 10 V; 2M H₂SO₄; 10°C



Obr. 14 Ukážka povrchu nanobodiiek zachytená pomocou SEM. Vľavo Au/TiO₂ nanoštruktúry pripravené za podmienok 15x2 mA 100 ms (žíhané s maskou). Vpravo žíhané TiO₂ nanobodky bez zlata. Žíhané pri 600 °C vo vákuu.

Na Obr. 14 je vidieť pole TiO₂ nanobodiiek pri rozlíšení 100 kx v merítke 200 nm, ktoré boli pripravené za rovnakých podmienok a to: 10 V; 2M H₂SO₄; 10 °C. Oba vzorky boli žíhané s maskou, ktorá bola následne odleptaná. Vľavo na obrázku je vidieť homogénne pole Au/TiO₂ nanobodiiek s roztrúsenými Au nanotyčkami. Vpravo sa nachádza homogénne pole žíhaných TiO₂ nanobodiiek.

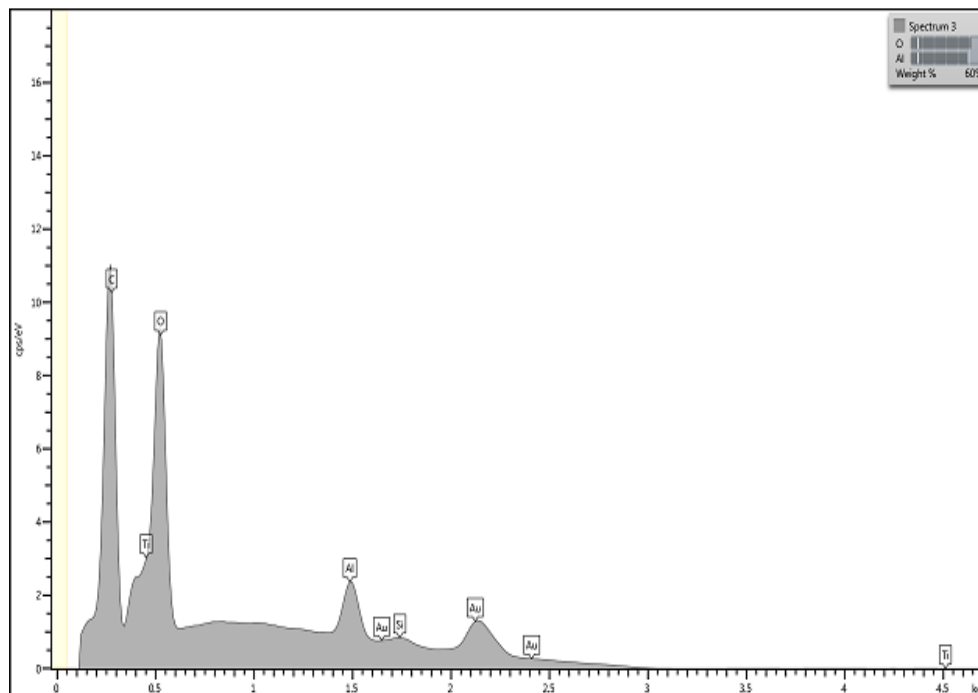
5.1.4 Charakterizácia TiO_2/Au nanoštruktúr vyrobených pri podmienkach: 20V; 1M H_2SO_4 ; 22°C



Obr. 15 Ukážka povrchu nanobodiek zachytená pomocou SEM. Vľavo Au/TiO_2 nanoštruktúry pripravené za podmienok 15x2 mA 100 ms (žíhané s maskou). Vpravo žíhané TiO_2 nanobodky bez zlata. Žíhané na 600 °C vo vákuu.

Obr. 15 zobrazuje pole TiO_2 nanoštruktúr pri rozlíšení 100 kx v merítke 200 nm, žíhaných s maskou, ktorá bola následne odleptaná. Vľavo sa nachádza vzorka s nadeponovanými nanotyčinkami zlata. Vpravo sa nachádza homogénne pole TiO_2 nanobodiek bez zlata. Porovnaním nanobodiek z Obr. 14 vpravo a Obr. 13 vpravo je viditeľná zmena veľkosti TiO_2 nanobodiek vplyvom väčšieho priloženého anodizačného napätia.

5.2 EDX analýza



Obr. 16 EDX analýza vrstvy TiO_2 nanoštruktúr so zlatom.

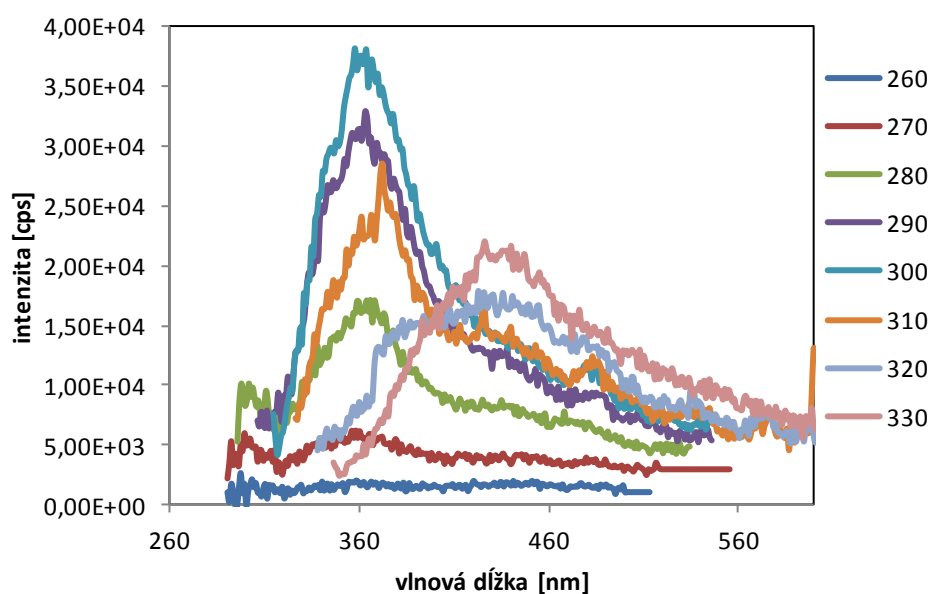
Z grafu EDX analýzy je možné vidieť kvalitatívne zastúpenie jednotlivých prvkov, ktoré sa nachádzajú na povrchu vzorku a tak sledovať jeho znečistenie. Najviac zastúpeným prvkom je uhlík, potom titán, kyslík, hliník kremík a zlato. Uhlík je síce nežiaducim prvkom, ale je to prirodzene vyskytujúci sa kontaminujúci prvok, ktorý pochádza z povrchových nečistôt TiO_2/Au na Ti vrstve. Dôležitým aspektom je, že sa na povrchu nenachádza žiadny prvok, ktorý by ovplyvňoval fluorescenciu nanoštruktúr.

5.3 Charakterizácia vzoriek pomocou fluorescenčného spektroskopu

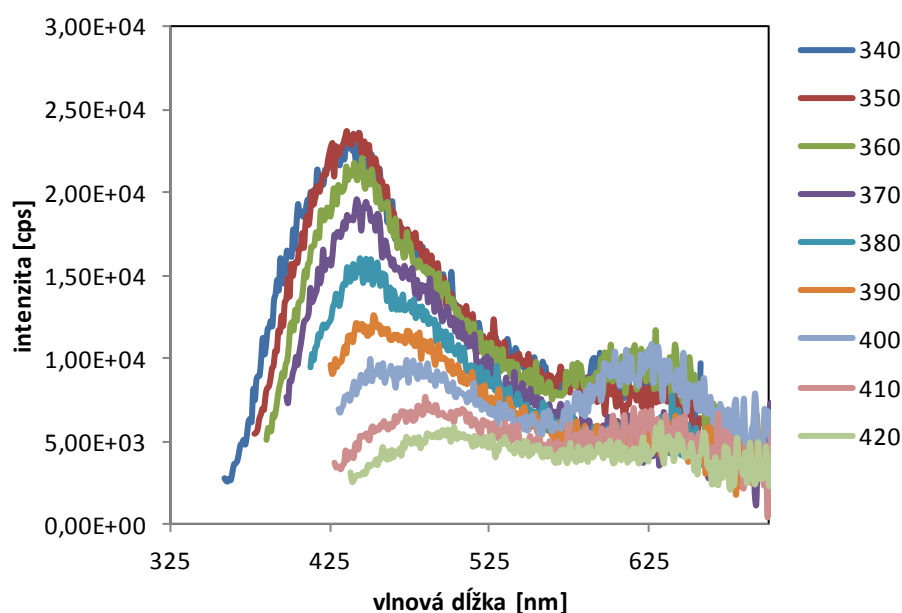
Táto časť zahŕňa vyhodnotené emisné spektrá vzoriek. V prvej podkapitole je porovnávaná luminiscencia pozadia ako Si, Al, Ti, držiaku na vzorky a ostatné kapitoly sa zameriavajú na TiO_2 , TiO_2/Au nanoštruktúry, ktoré boli pripravené za rôznych podmienok. Kvôli lepšej názornosti sú fluorescenčné spektrá pre dané vzorky vždy rozdelené do dvoch častí podľa excitačných vlnových dĺžok. Spektrá boli upravované tak, aby sa v nich nenachádzal pozostatok luminiscencie lampy a taktiež harmonické funkcie.

5.3.1 Fluorescenčné vlastnosti povrchu držiaku na vzorky, Si, Al a Ti

Pre uistenie, že na fluorescenciu nanočastíc nemá vplyv okolie, bola zmeraná emisia všetkých potenciálnych prvkov, ktoré by mohli skresliť výsledné spektrum vzoriek s TiO₂/Au QDs. Keďže vzorky boli pripravované na kremíkovom waferi, na ktorom bola nanosená vrstva titánu a hliníka, skúmala sa ich luminiscencia. Meraný bol taktiež aj držiak, do ktorého sa pripevňovali vzorky, pretože niektoré vzorky dosahovali menšie rozmery ako otvor držiaku.

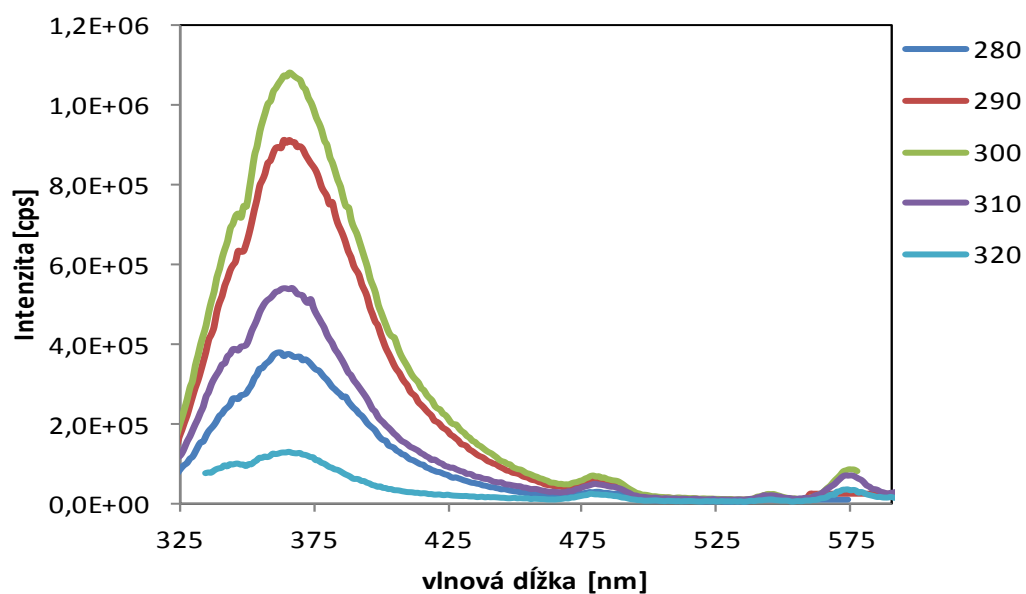


Obr. 17 Emisné spektrá držiaku na vzorky pri excitačných vlnových dĺžkach 260-330 nm.

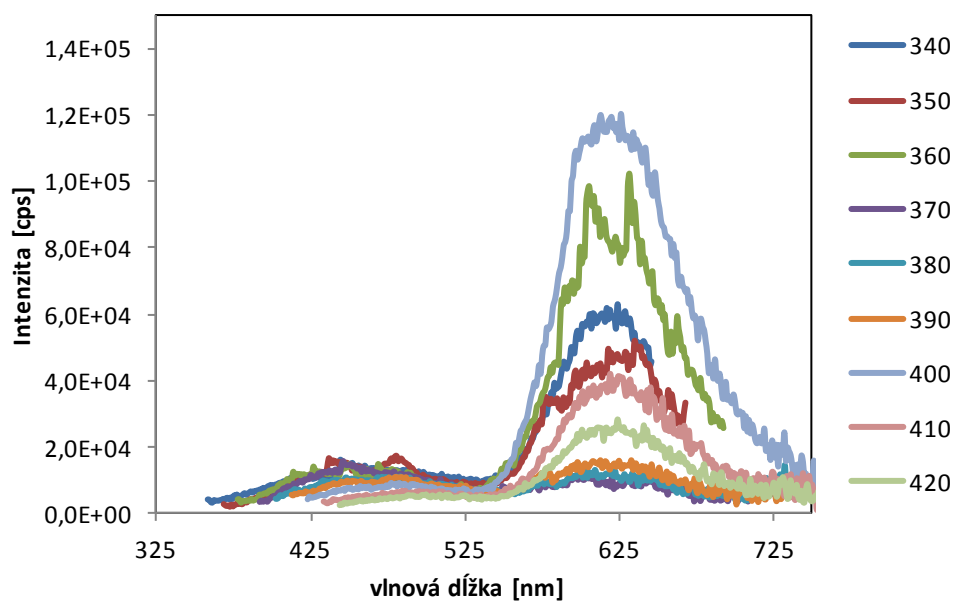


Obr. 18 Emisné spektrá držiaku na vzorky pri excitačných vlnových dĺžkach 340-420 nm.

Držiak na vzorky vykazuje najnižšiu intenzitu emisie zo všetkých meraných povrchov. Výrazné píky sa nachádzajú v oblasti 375 nm pre excitačné vlnové dĺžky 270-310 nm. Pre zvyšné spektrálne čiary platí, že píky sa so zvyšujúcou excitáciou posúvajú smerom do vlnových dĺžok modrej oblasti. Z tohto vyplýva, že fluorescenčné spektrá všetkých meraných vzoriek môžu byť negatívne ovplyvnené spektrami držiaku. To znamená, že by sa pre vyhodnotenie fluorescencie vzorkov mala urobiť korekcia odčítaním spektra držiaku a jednotlivých spektier. Toto odčítanie by zrejme veľmi deformovalo spektrá vzorkov (posunom intenzity do záporných hodnôt), preto sú všetky výsledky z fluorescenčnej analýzy vzorkov ponechané bez korekcie.



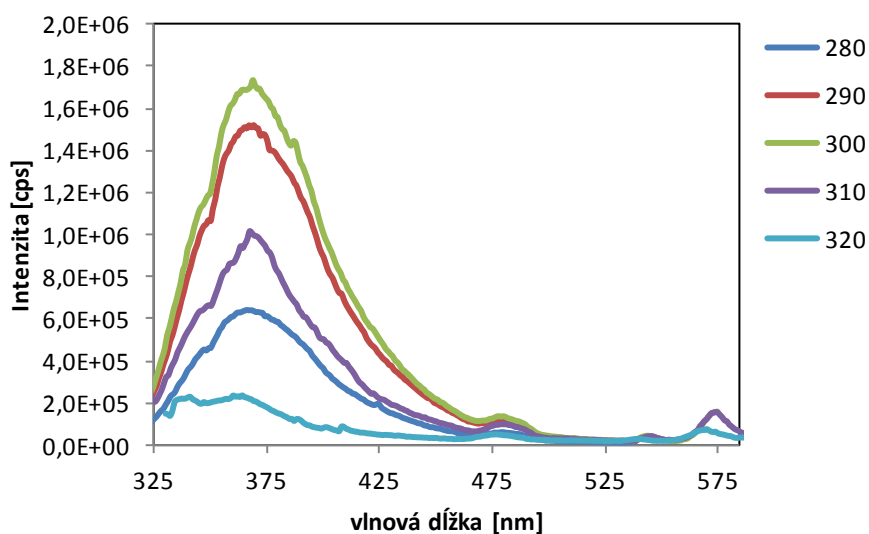
Obr. 19 Emisné spektrá Si substrátu pre excitačné vlnové dĺžky 280-320 nm.



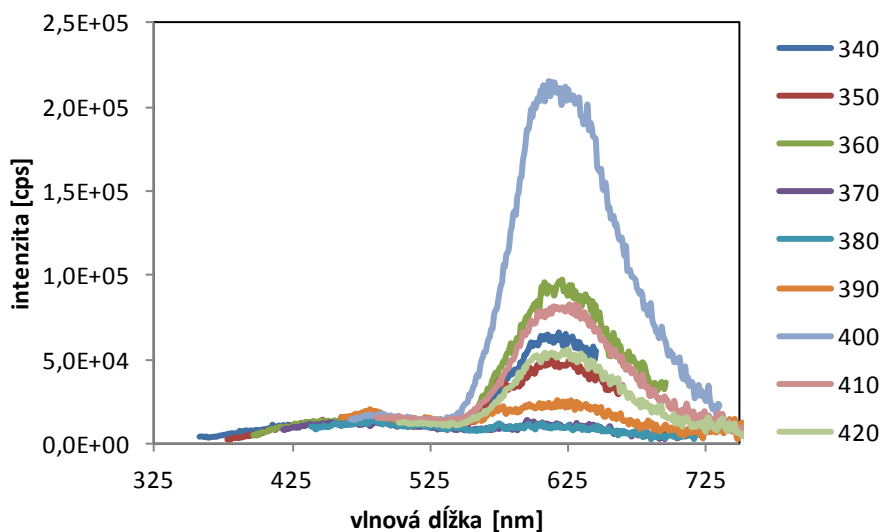
Obr. 20 Emisné spektrá Si substrátu pre excitačné vlnové dĺžky 340-420 nm.

Vzhľadom na meranú emisiu pri daných excitačných vlnových dĺžkach možno na Obr. 19 vidieť výrazné píky v oblasti 375 nm. Najvyšší pík sa objavuje pri excitácii 300 nm s intenzitou väčšou ako 10^6 cps. Dva menšie píky sa nachádzajú v oblasti 480 nm a 575 nm. Spektrum na Obr. 20 má pre dané excitačné vlnové dĺžky pomalý nárast v oblasti 475 nm, s najvyššou hodnotou intenzity rádovo okolo 2×10^4 cps pre

excitáciu 350 nm. V druhej polovici spektra sa nachádzajú píky v oblasti 625 nm. Pík s najvyššou intenzitou sa objavuje pri excitačnej vlnovej dĺžke 400 nm.



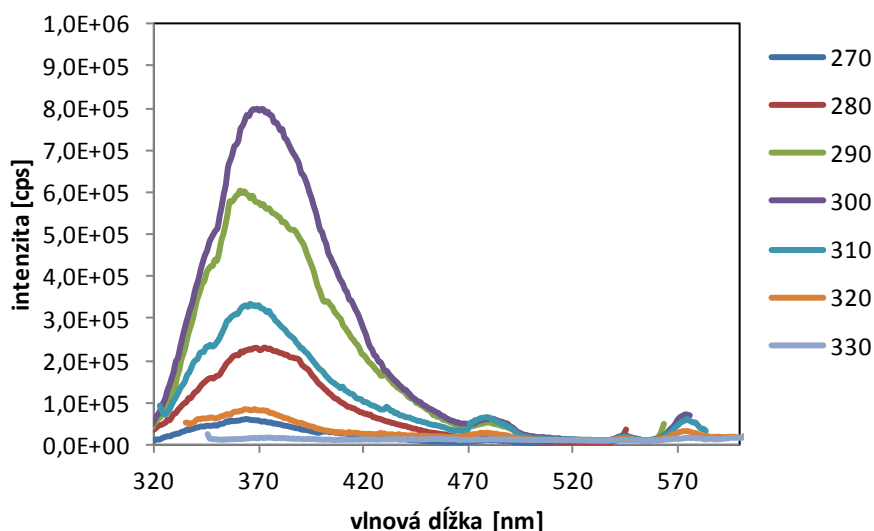
Obr. 21 Emisné spektrá Al vrstvy pre excitačné vlnové dĺžky 280-320 nm



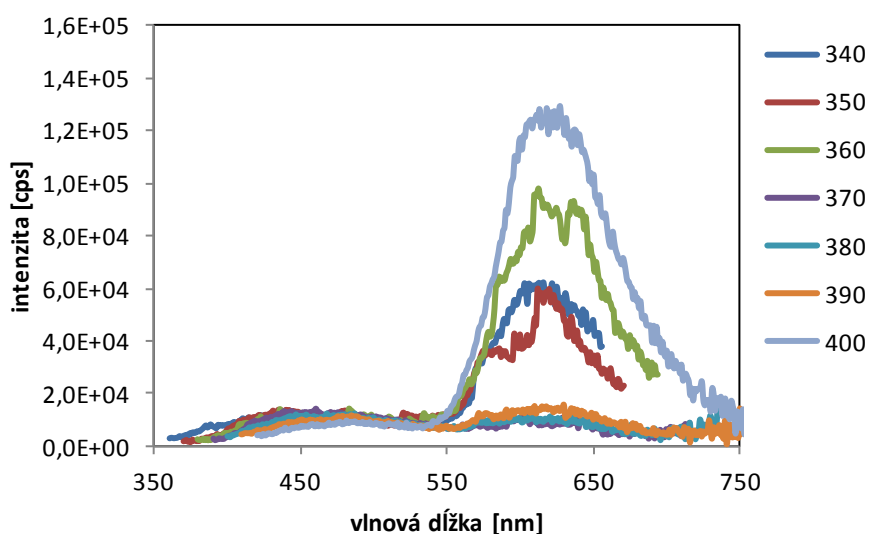
Obr. 22 Emisné spektrá Al vrstvy pri excitačných vlnových dĺžkach 340-420 nm.

Hliník rovnako ako kremík vykazuje v excitačnej oblasti 280-320 nm tri píky. Najvyšší sa taktiež nachádza v oblasti 375 nm pri excitácii 300 nm. Pre excitačné vlnové dĺžky 340-420 nm sa výrazné emisné píky objavujú v druhej polovici spektra v oblasti 625 nm. Pík s najvyššou intenzitou emisie je charakteristický pre excitáciu

400 nm. Podľa Castro-Lopez et. al. [40], ktorí skúmali on a off rezonančné vlastnosti Al, Au a Ag v procese dvojfotónovej luminiscencie zistili, že Al vykazuje o dva rády vyššiu luminiscenciu než Ag a Au.



Obr. 23 Emisné spektrá vrstvy Ti pri excitačných vlnových dĺžkach 270-330 nm.

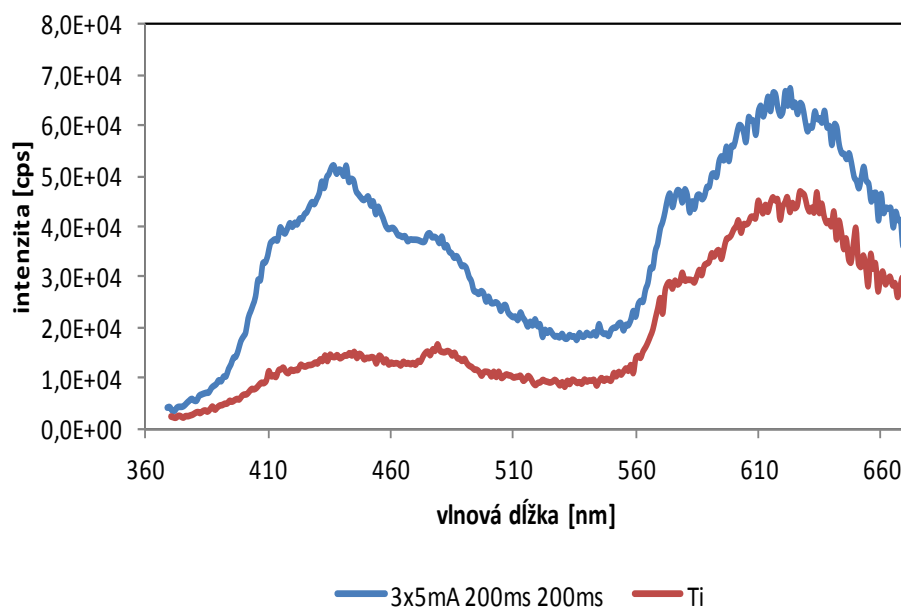


Obr. 24 Emisné spektrá vrstvy Ti pri excitačných vlnových dĺžkach 340-400 nm.

Spektrum titánu je rovnaké ako pri predošlých dvoch pozorovaných prvkov. Najvyššie píky sa nachádzajú v oblasti 375 nm pre excitáciu 300 nm a v oblasti 625 nm pri excitácii 400 nm. Líši sa len svojou intenzitou, ktorá je najmenšia v porovnaní s hliníkom a kremíkom.

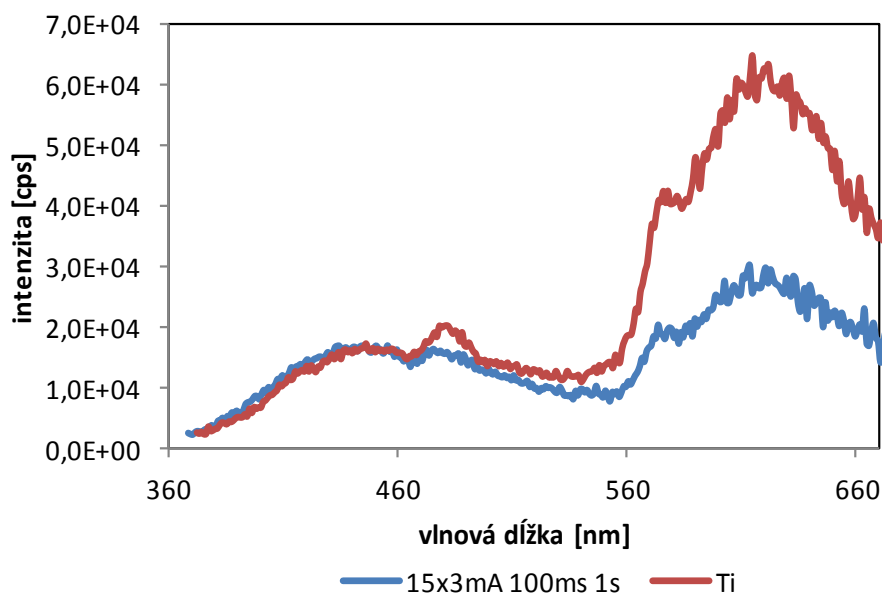
5.3.2 Fluorescenčné vlastnosti TiO_2 , TiO_2/Au QDs pripravených pri 5 V; 3 M H_2SO_4 ; 10 °C

V nasledujúcej podkapitole sú uvedené fluorescenčné spektrá Au/TiO_2 a TiO_2 nanočastíc pripravených za rovnakých podmienok: 5 V, 3 M H_2SO_4 , 10 °C. Rozdielna je pulzná depozícia zlata, ktorej podmienky sa nachádzajú vždy v popise obrázka. Prvé dve spektrá (Obr. 25 Obr. 26) sú merané pri excitačnej vlnovej dĺžke 350 nm. Ostatné dva vzorky (Obr. 27 Obr. 28) zahŕňajú emisné spektrá v rozmedzí vlnových dĺžok 280-410 nm.



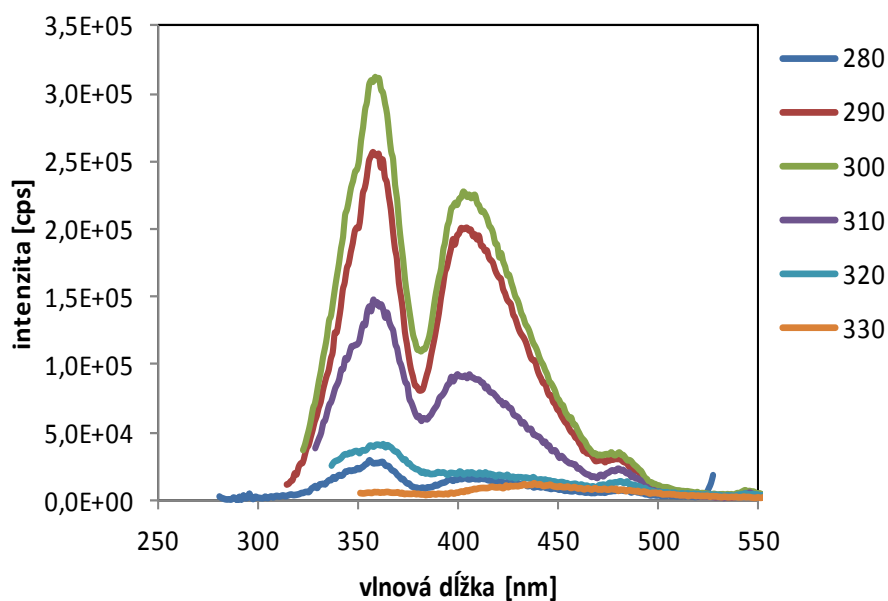
Obr. 25 Emisné spektrum vzorky TiO_2/Au pripravenej za podmienok 3x5 mA 200 ms 200 ms a pozadia Ti. Excitácia: 350 nm.

Na obrázku Obr. 25 je vidno modrou farbou znázornené široké spektrum, ktoré obsahuje tri píky v oblasti 410 nm, 440 nm a 480 nm a jeden najvýraznejší v oblasti 630 nm. Červenou farbou je znázornená fluorescencia titánu. Emisia najvyšších píkov prevyšuje intenzitu pozadia Ti a Al.

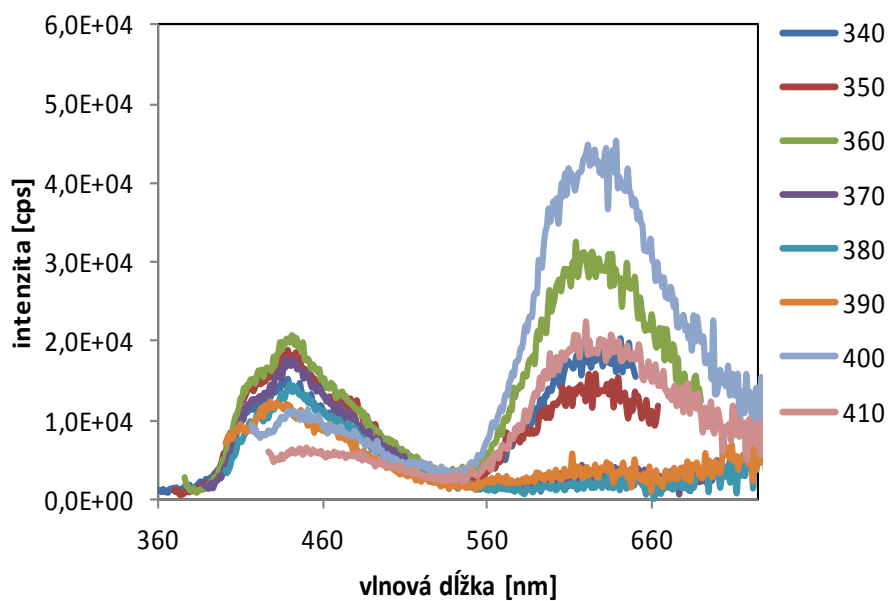


Obr. 26 Emisné spektrum TiO_2/Au vzorky pripravenej za podmienok 15x3mA 100ms 1s a pozadia Ti. Excitácia: 350nm.

Na Obr. 26 je vidno široké spektrum TiO_2/Au vzorky znázornenej modrou farbou, ktorá vykazuje nízku fluorescenciu a v podstate kopíruje spektrum titánu v oblasti do 460 nm. Potom spektrum titánu prevyšuje intenzitu vzorku a vykazuje najvyšší pík v oblasti približne 620 nm.



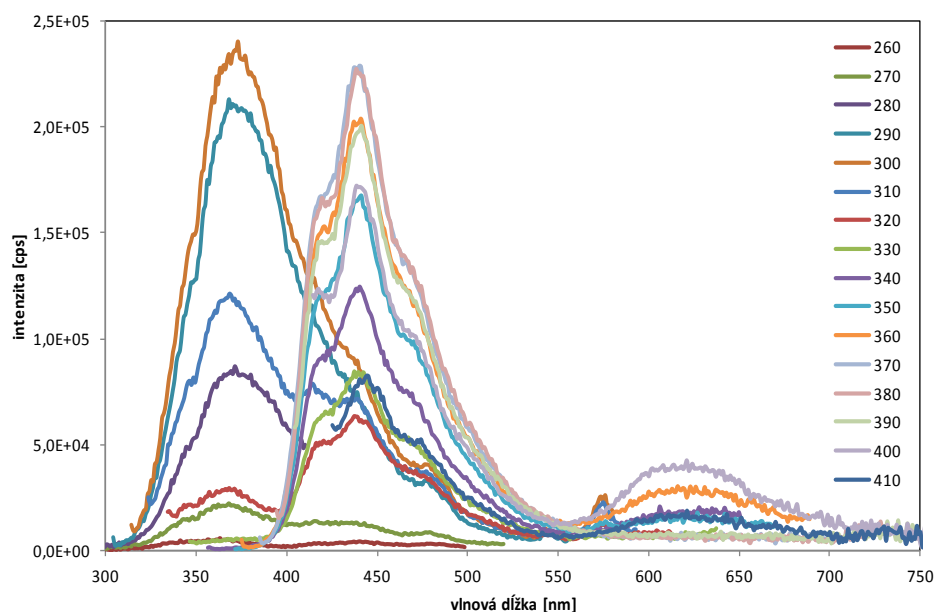
Obr. 27 Emisné spektrum vzorky s TiO₂ nanobodkami bez zlata, žíhanými pri 800 °C v rozsahu excitačných vlnových dĺžok 280-330 nm.



Obr. 28 Emisné spektrum vzorky s čistými TiO₂ nanobodkami bez zlata, žíhanými pri 800 °C v rozsahu excitačných vlnových dĺžok 340-410 nm.

Na Obr. 27 a Obr. 28 sa nachádza emisné spektrum žíhaných TiO₂ nanobodiek bez zlata. Žíhaním nanoštruktúry nadobudnú kryštalografickú fázu, pričom by mali

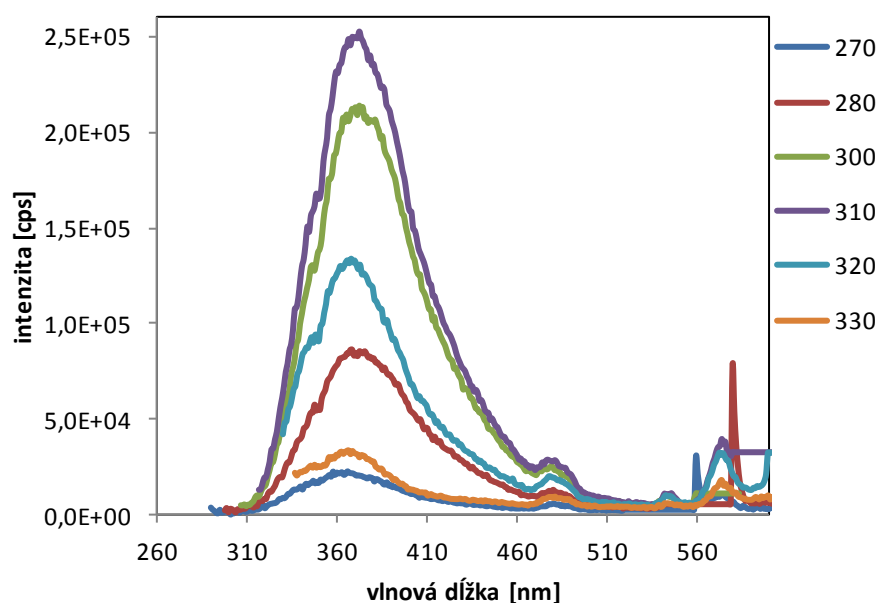
vykazovať silnejšiu emisiu žiarenia. Na Obr. 27 sa nachádza spektrum rozdelené do dvoch pík. Prvý užší pík, s najvyššou intenzitou pri excitácii 300 nm sa nachádza v oblasti 360 nm. Druhý širší pík sa nachádza v oblasti 410 nm. Na Obr. 28 vykazuje najvyššiu intenzitu emisie spektrum pre excitáciu 360 nm a to v oblasti približne 435 nm. Pri rovnakých hodnotách excitácie emituje žiarenie aj držiak na vzorky. Druhá časť spektra by už mohla prislúchať titánu, pretože pík o excitačnej vlnovej dĺžke 400 nm sa nachádza presne v danej oblasti cca 640-650 nm, kde sa nachádza aj pík titánu s totožnou excitačnou vlnovou dĺžkou.



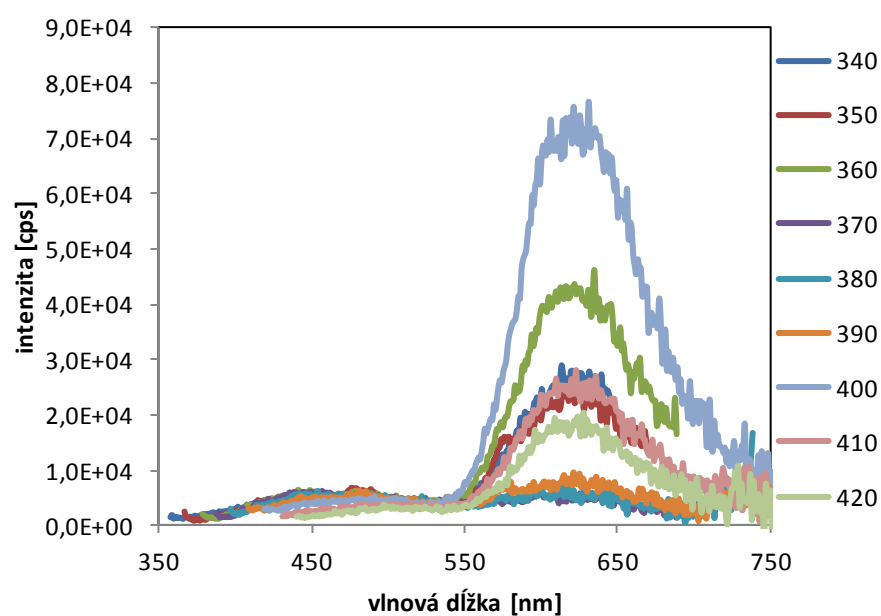
Obr. 29 Emisné spektrá vzorky pre excitačné vlnové dĺžky v rozmedzí 260-410 nm pripravenej za podmienok 15x3mA 100ms 1s.

Na Obr. 29 sú znázornené emisné spektrá vzorky, ktorá bola pripravená za rovnakých podmienok depozície zlata ako vzorka na Obr. 26, tj. 15x3mA 100ms 1s. Emisia v rozmedzí excitačných vlnových dĺžok 280-310 nm sa nemôže brať do úvahy, pretože na rovnakých vlnových dĺžkach emituje žiarenie aj pozadie. Pík s intenzitou cca $2,2 \times 10^5$ cps, ktorý by mohol prislúchať nanoštruktúram sa nachádza na cca 450 nm pri excitačnej vlnovej dĺžke 370-380 nm.

5.3.3 Fluorescenčné vlastnosti TiO₂, TiO₂/Au QDs pripravených pri 10 V; 2 M H₂SO₄; 10 °C

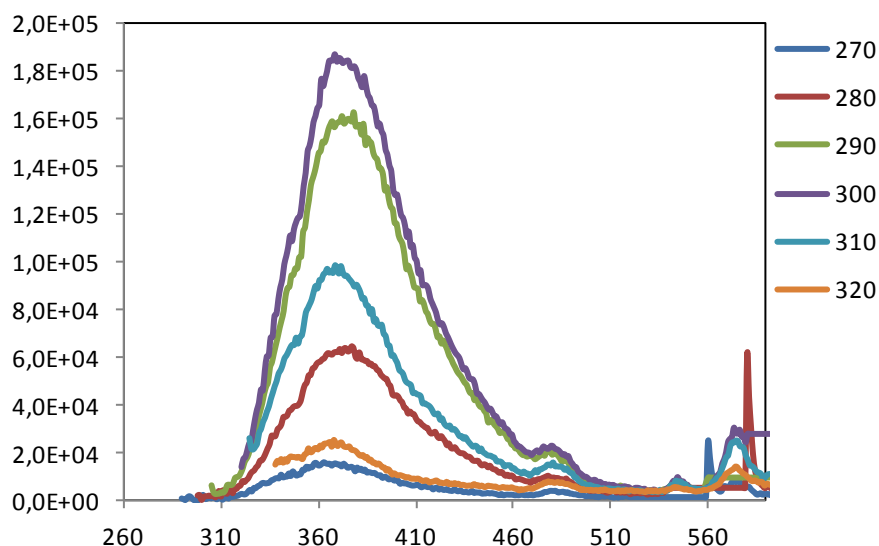


Obr. 30 Emisné spektrá žíhaných TiO₂ nanočastíc v rozsahu excitačných vlnových dĺžok 270-330 nm.

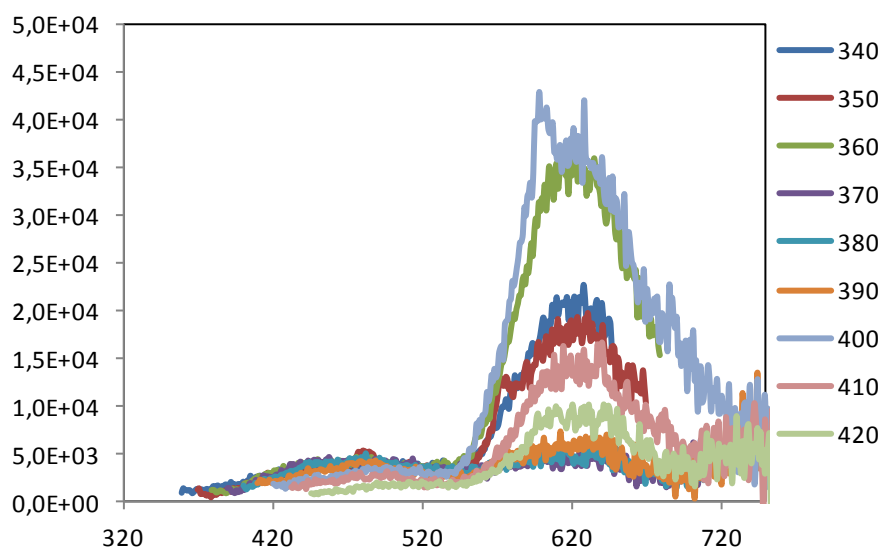


Obr. 31 Emisné spektrá žíhaných TiO₂ nanočastíc v rozsahu excitačných vlnových dĺžok 340-420 nm.

Na Obr. 30 sa nachádzajú tri píky v oblasti 370, 780 a 570 nm. V oblasti 570 nm sa nejedná o píky (červená a modrá farba), ale o znázornené druhé harmonické funkcie pre excitácie 270 a 280 nm. Obr. 31 ukazuje široké píky v oblasti okolo 460 nm so zanedbateľnou intenzitou emisie a spektrum v oblasti 650 nm s nízkym pomerom signál/šum. Rovnaké spektrum vykazuje aj titán, dokonca obsahuje píky s vyššou intenzitou.



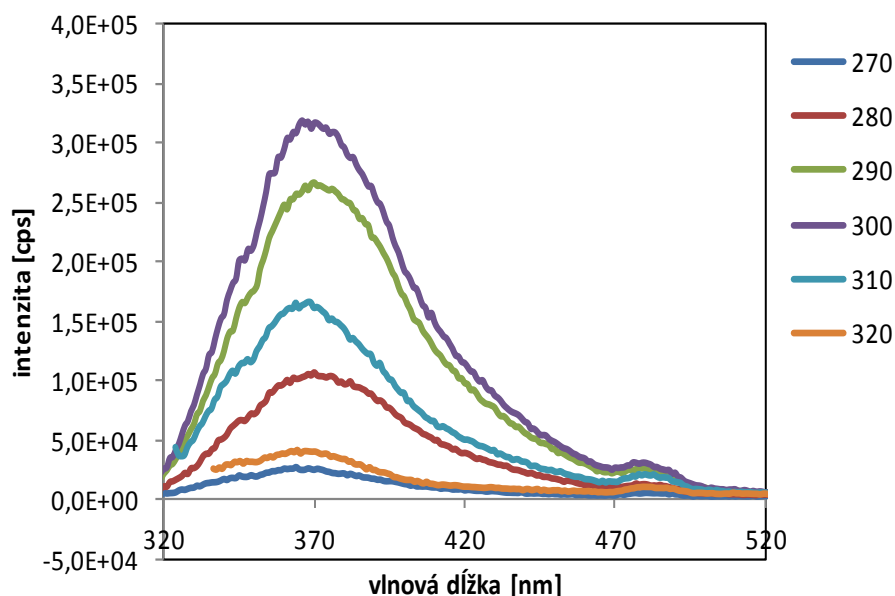
Obr. 32 Emisné spektrá žíhaných Au/TiO₂ nanočastíc pripravených za podmienok 15x2mA 100 ms v rozsahu excitačných vlnových dĺžok 270-320 nm.



Obr. 33 Emisné spektrá žíhaných Au/TiO₂ nanočastíc pripravených za podmienok 15x2 mA 100 ms v rozsahu excitačných vlnových dĺžok 340-420 nm.

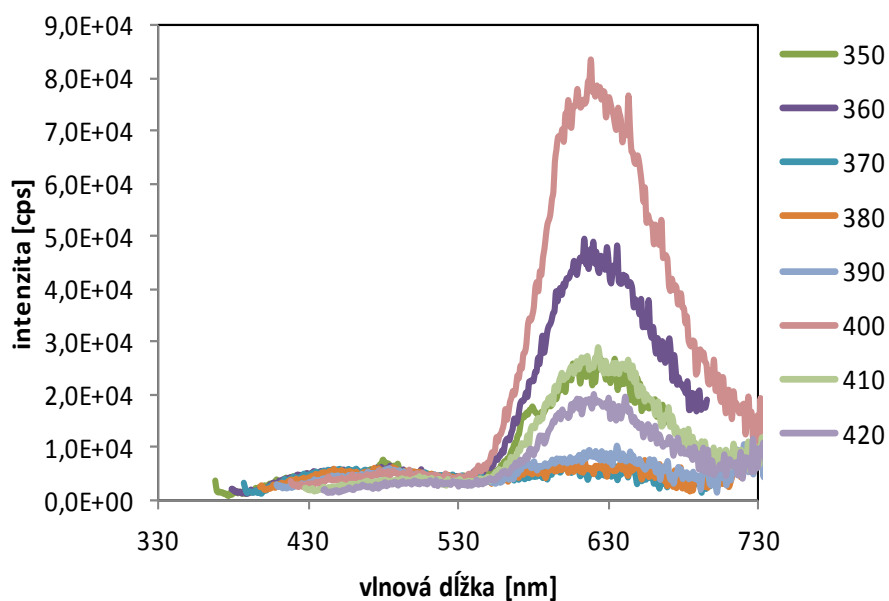
Na Obr. 32 a Obr. 33 vidieť spektrá žíhaných Au/TiO₂ nanočastíc. Oproti žíhaným TiO₂ nanočasticiam bez zlata poklesla intenzita emisie u všetkých vlnových dĺžok. Tvarovo sa spektrá nijak nelíšia, akurát u TiO₂ nanočastíc bez zlata je najvyššia intenzita emisie pri excitácii 310 nm. U Au/TiO₂ nanočastíc je najvyššia intenzita emisie pri excitácii 300 nm. V oboch prípadoch žihania - či už Au/TiO₂, alebo TiO₂ nenastala situácia ako pri podmienkach 5V; 3 M H₂SO₄; 10 °C (Obr. 27 a Obr. 28), že by sa emisné spektrá vykazovali dva píky v oblasti 360 nm a 410 nm pre excitačné vlnové dĺžky 270-320 nm.

5.3.4 Fluorescenčné vlastnosti TiO₂, TiO₂/Au QDs pripravených pri 20V 1M H₂SO₄ 22°C

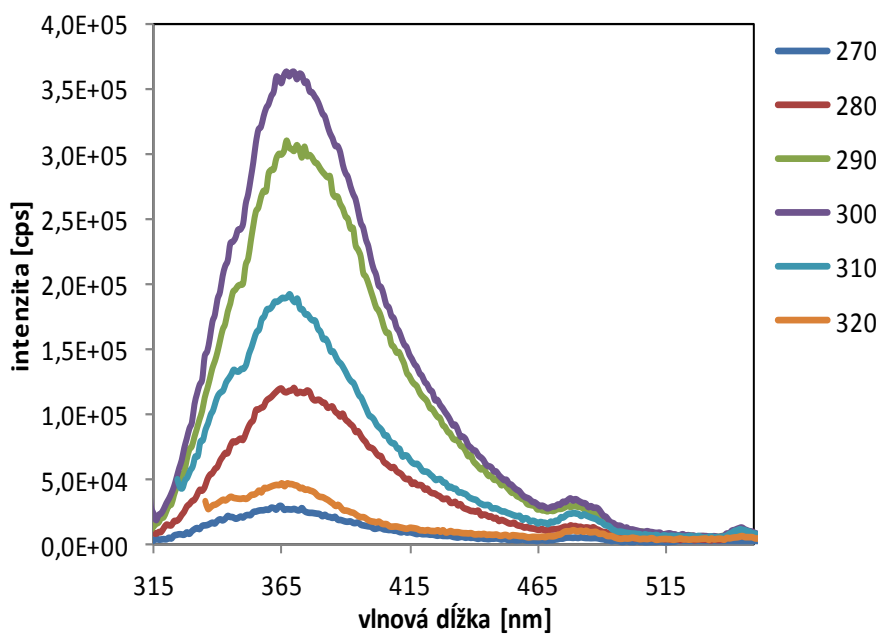


Obr. 34 Emisné spektrá žíhaných Au/TiO₂ nanočastíc pripravených za podmienok 15x2mA 100 ms v rozsahu excitačných vlnových dĺžok 270-320 nm.

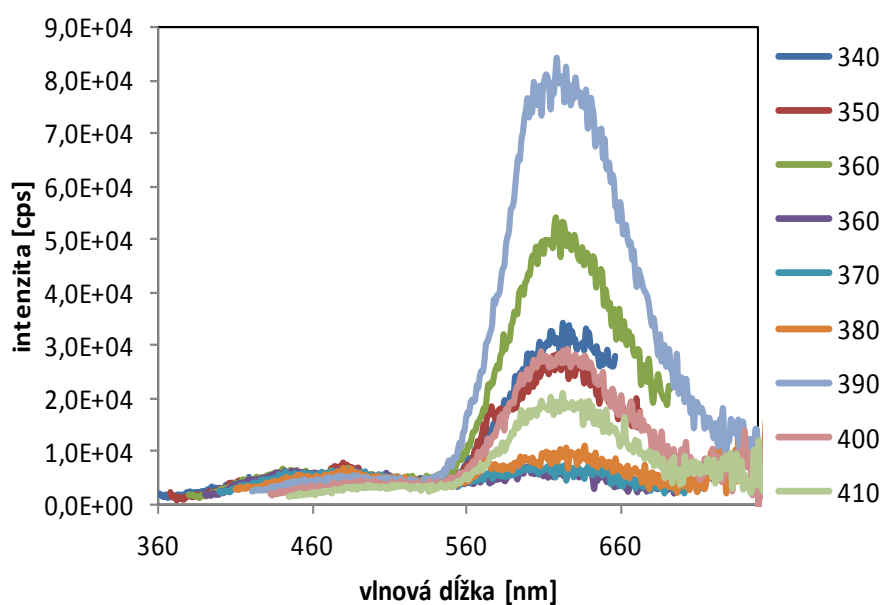
Nanoštruktúry vytvorené vplyvom najvyššieho anodizačného napätia vykazujú rovnaké emisné spektrá ako predošlé, vytvorené pri napätí 10 V.



Obr. 35 Emisné spektrá žíhaných Au/TiO₂ nanočastíc pripravených za podmienok 15x2mA 100 ms v rozsahu excitačných vlnových dĺžok 350-420 nm.



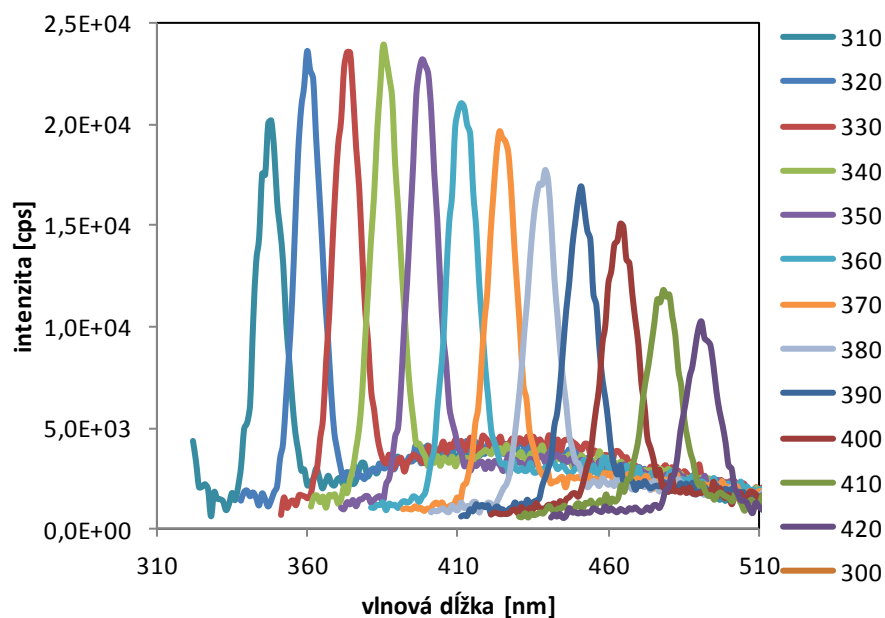
Obr. 36 Emisné spektrá žíhaných TiO₂ nanočastíc v rozsahu excitačných vlnových dĺžok 270-320 nm.



Obr. 37 Emisné spektrá žíhaných TiO_2 nanočastíc v rozsahu excitačných vlnových dĺžok 340-410 nm.

5.4 Biofunkcionalizácia thymopoietínom

5.4.1 Fluorescencia thymopoietínu

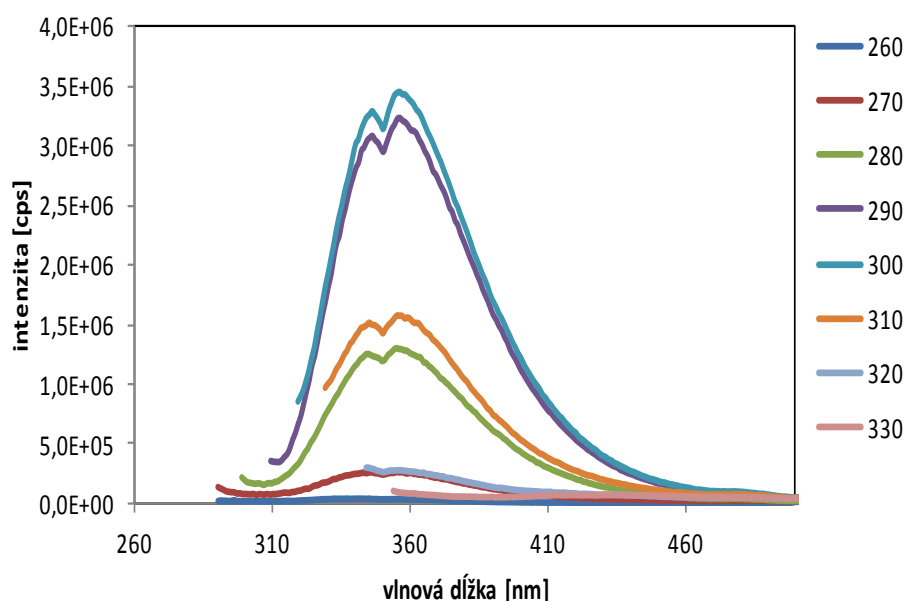


Obr. 38 Fluorescenčné spektrá thymopoietínu ($c=0,1\text{mg/ml}$) pri excitačných vlnových dĺžkach 310-420 nm.

Na Obr. 38 sú vidieť emisné spektrá thymopoietínu v rozmedzí 300-420 nm. Z obrázka je patrné, že najvyššia intenzita emisie sa dosahuje v tomto excitačnom pásme pre excitačné vlnové dĺžky 320, 330 a 340 nm. So zvyšujúcou sa excitačnou dĺžkou klesá intenzita emisie. Oproti ostatným meraným vzorkám vykazuje thymopoietín hladké spektrá.

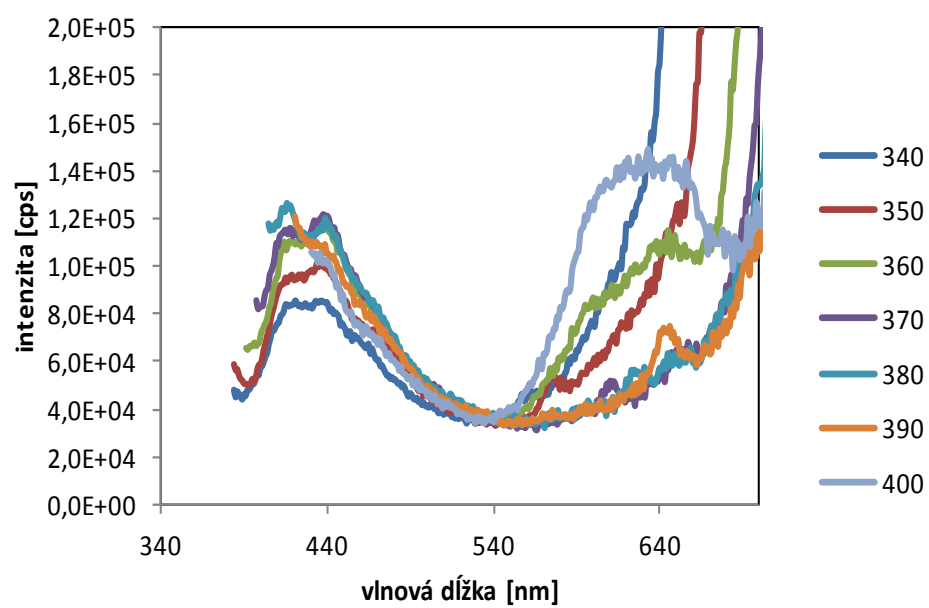
5.4.2 Fluorescenčné vlastnosti vzorku s thymopoietínom

Biofunkcionalizované boli Au/TiO₂ (Obr. 29) boli molekulou TM o objeme 18 µl, pripravené za podmienok: 5V; 3 M H₂SO₄, 15x3 mA 100ms 1s.



Obr. 39 Emisné spektrá vzorky pripravenej za podmienok 5 V 3M H₂SO₄; 15x3 mA 100 ms 1 s funkcionalizovanej thymopoietínom, v rozsahu excitačných vlnových dĺžok 260-330 nm.

Emisné spektrum nanoštruktúr sa po funkcionalizácii tvarovo zmenilo. Spektrum po funkcionalizácii thymopoietínom obsahuje rozštiepený pík. Zameraním sa na excitačné vlnové dĺžky 370 a 380 nm môžeme pozorovať, že vplyvom thymopoietínu poklesla intenzita emisie z $2,25 \times 10^5$ cps na $1,2 \times 10^5$ cps, avšak pri excitačnej vlnovej dĺžke 300 nm môžeme pozorovať nárast intenzity z $2,5 \times 10^5$ cps na $3,5 \times 10^6$ cps. Zvyšovanie intenzity fluorescencie pozoroval aj Singh et.al. [41], ktorý skúmal konjugáty zlatých nanočastíc a CdS/T QDs s hovädzím sérovým albumínom.



Obr. 40 Emisné spektrá Au/TiO₂ vzorky pripravenej za podmienok 5 V 3M H₂SO₄; 15x3 mA 100 ms 1 s funkcionalizovanej thymopoietínom, v rozsahu excitačných vlnových dĺžok 340-400 nm.

6 Záver

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo najprv teoreticky sa zoznámiť s nanoštruktúrami, obzvlášť s deponovanými kvantovými bodkami, ich prípravou, modifikáciou, funkcionalizáciou a biomedicínskymi aplikáciami ako je napríklad detekcia biomolekúl. Z teoretickej štúdie vyplynulo, že kvantové bodky najmä v koloidnej forme môžu mať široké uplatnenie v bioanalytických aplikáciách a v biomedicínskom výskume. Bohužiaľ deponované kvantové bodky nie sú až takou oblasťou záujmu a neexistuje k nim dostatočné množstvo literatúry s porovnaním ku koloidným QDs.

TiO₂ QDs boli pripravované anodickou oxidáciou a modifikované zlatou vrstvou v procese pulznej depozície. Pokrytie všetkých vzoriek bolo analyzované na SEM. Porovnaním jednotlivých snímok je vidieť ako sa so zvyšujúcim anodizačným napätím v procese anodickej oxidácie zväčšuje priemer kvantových bodiek. Táto skutočnosť je spôsobená tým, že anodizačné napätie ovplyvňuje v prvom rade veľkosť pórov v Al₂O₃ maske, od ktorých sa odvíja veľkosť nanoštruktúr. Anodická oxidácia teda predstavuje lacnú a unikátnu metódu, ktorá umožňuje reprodukovateľné pokrytie nanoštruktúrami v širokej škále rozmerov. Aby sa získala kryštalografická štruktúra nanočastíc, podliehali žihaniu na vzduchu pri 800 °C a vo vákuu pri 600°C.

U pripravených nanoštruktúr boli následne pozorované ich optické, konkrétne fluorescenčné vlastnosti. Aby sa zistila luminiscencia pozadia boli zmerané všetky prvky, ktoré by mohli ovplyvniť fluorescenciu nanočastíc. Fluorescenčným meraním sa zistilo, že prvky pozadia (Si, Al, Ti, držiak na vzorky) emitujú svetlo o značne vysokej intenzite v oblasti 375, 480, 575 nm pre excitačné vlnové dĺžky 270-330 nm. Porovnaním intenzity emisie všetkých meraných prvkov by sa dala zostaviť zostupná závislosť: Al>Si>Ti>držiak na vzorky.

Fluorescenčné meranie nanoštruktúr bolo rozdelené do troch častí podľa podmienok prípravy TiO₂ nanoštruktúr a to na a) 5V; 3 M H₂SO₄; 10 °C, b) 10 V; 2 M H₂SO₄; 10 °C, c) 20V 1M H₂SO₄ 22°C. V prípade a) boli k fluorescenčnému meraniu použité vzorky modifikované zlatom pripravené za podmienok 3x5mA 200ms 200ms a za podmienok 15x3mA 100ms 1s. Fluorescenciu, ktorá sa nezhodovala s pozadím a mohla by prislúchať nanoštruktúram vykazovali nanobodky pripravené za oboch podmienok. Ďalej boli pozorované aj, žíhané TiO₂ nanobodky pri 800 °C, u ktorých sa prejavilo spektrum s dvoma píkmi v oblasti, ktorá taktiež neprislúcha pozadiu.

V prípade b) a c) boli pozorované žíhané, zlatom modifikované TiO₂ nanočastice a TiO₂ nanočastice žíhané bez modifikácie. Žíhanie prebehlo v oboch prípadoch rovnako – vo vákuovej peci na 600°C. Vytvorené nanobodky boli najskôr žíhané a potom prebehla depozícia zlata. Výsledky nepotvrdili spektrum rozdelené na dve časti tak ako pri nanobodkách v prípade a).

Ďalšia časť práce zahŕňa biofunkcionalizáciu vzorku Au/TiO₂ pripraveného za podmienok 5 V 3 M H₂SO₄; 15x3 mA 100 ms 1s thymopoietínom o koncentracii 1 mg/ml. Porovnaním vzorku pred a po funkcionizácii je vidieť, že došlo k poklesu intenzity o 1,05x10⁵ cps v oblasti 450 nm pre excitačné vlnové dĺžky 370 a 380 nm. Na druhej strane je zas vidieť nárast intenzity emisie pri excitácii 300 nm.

V prípade pár vzoriek sa preukázala intenzita fluorescence, ktorá nepatrila pozadiu a eventuálne by mohla prislúchať nanoštruktúram. Ako pozoroval Luo et. al. [15] so znižujúcimi sa rozmermi nanočastíc by mala stúpať luminiscencia nanočastíc. Zo zistených výsledkov sa však nemôže sledovanie optických vlastností deponovaných kvantových bodiek pomocou fluorescenčného spektroskopu považovať za objektívne, pretože vzorky vykazovali v drvivej väčšine nízku fluorescenciu. Po vyžíhaní by mal amorfný oxid titaničitý meniť svoju kryštalografickú štruktúru a tak zvyšovať intenzitu emitovaného žiarenia. Tento jav sa potvrdil pri podmienkach 5V; 3 M H₂SO₄, čo je správne, pretože QDs dosahovali požadované rozmery na to, aby sa splnil efekt kvantového obmedzenia. Možným dôvodom, prečo deponované QDs nevykazujú takú vysokú intenzitu emisie žiarenia ako koloidné, je práve ich umiestnenie na pevnom substráte, ktorý pokrýva a skresľuje emisiu žiarenia nanoštruktúr. Ďalším dôvodom môže byť použitie polarizátorov, ktoré potláčali odraz zo substrátu a tak mohli potláčať aj intenzitu emisie nanoštruktúr. V prípade, že by vzorka bola menších rozmerov, mohol lúč zasahovať aj mimo pole vytvorených nanoštruktúr a tak skresľovať emisiu nanobodiek vplyvom emisie hliníka a držiaku na vzorky.

7 Zoznam skratiek

QDs	Quantum Dots (kvantové bodky)
Au	zlato
TiO ₂	oxid titaničitý
AAO	anodized aluminium oxide
Al ₂ O ₃	oxid hlinitý
SEM	Scanning Electron Microscopy (skenovacia elektrónová mikroskopia)
TEM	Transmission electron microscopy (transmisná elektrónová mikroskopia)
CCD	charge-coupled device
XPS	Röntgenová fotoelektronová spektroskopia
EDX	Energiovo-disperzná röntgenová spektroskopia
FCS	Fluorescenčná korelačná spektroskopia
UV	ultrafialové žiarenie
H ₃ PO ₄	kyselina trihydrogénfosforečná
H ₂ SO ₄	kyselina sírová
GNPs	zlaté nanočastice
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
TM	thymopoietin

Citácie

1. Tiwari, P.M., et al., *Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications*. Nanomaterials, 2011. **1**(1): p. 31-63.
2. Vorozhtsova, M., J. Drbohlavova, and J. Hubalek, *Chemical Microsensors with Ordered Nanostructures*, in *In Microsensors 2011*, Intech: Rijeka, Croatia. p. 143-158.
3. Hou, P., et al., *Carbon nanotubes prepared by anodic aluminum oxide template method*. Chinese Science Bulletin, 2011. **57**(2-3): p. 187-204.
4. Tsai, T.-G., et al., *Self-organized titanium oxide nanodot arrays by elektrochemical anodization*. Applied physics letters, 2003. **82**(17).
5. Lan, H. and Y. Ding, *Ordering, positioning and uniformity of quantum dot arrays*. Nano Today, 2012. **7**(2): p. 94-123.
6. Song, Y.-Y., et al., *Galvanic Deposition of Nanostructured Noble-Metal Films on Silicon*. Electrochemical and Solid-State Letters, 2005. **8**(10): p. C148.
7. Chen, P.L., *Fabrication and field emission characteristics of highly ordered titanium oxide nanodot arrays*. Electrochemical and Solid State Letters, 2005. **8**: p. H83-H86.
8. Chu, S.Z., *Self-organized nanoporous anodic titania films and ordered titania nanodots/nanorods on glass*. Advanced Functional Materials, 2005. **15**(8): p. 1343-1349.
9. S.Z.Chu, *A new electrochemical lithography - Fabrication of self-organized titania nanostructures on glass by combined anodization*. Journal of the Electrochemical Society, 2005. **152**(3): p. B116-B124.
10. Drbohlavova, J., et al., *Quantum dots - characterization, preparation and usage in biological systems*. International journal of molecular sciences, 2009. **10**(2): p. 656-73.
11. *Elektrochemické analytické metody*. 2012; Available from: http://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/elektroa.htm.
12. Melnyk, V., et al., *Low-temperature luminescence of different TiO₂ modifications*. Journal of Molecular Structure, 2005. **744-747**(0): p. 573-576.
13. Behera, D., B. Bag, and R. Sakthivel, *Synthesis, characterization and photoluminescence study of modified titania*. Indian Juornal of Pure and Applied Physics, 2011. **49**: p. 754-758.

14. Kumar, S., N.K. Verma, and M.L. Singla, *Size dependent reflective properties of TiO₂ nanoparticles and reflectors made thereof*. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 2012. **7**(2): p. 607-619.
15. Luo, M., et al., *Size-dependent ultraviolet luminescence and low-field electron emission of TiO₂ nanodots formed by phase-separation-induced self-assembly*. Journal of Physics 2009. **42**.
16. Abazovic', N.D., et al., *Photoluminescence of Anatase and Rutile TiO₂ Particles*. J. Phys. Chem., 2006: p. 25366-25370.
17. Liu, J., et al., *Structure and Photoluminescence Study of TiO₂ Nanoneedle Texture along Vertically Aligned Carbon Nanofiber Arrays*. J. Phys. Chem., 2008: p. 17127–17132.
18. Pan, D., et al., *Facile Synthesis and Characterization of Luminiscent TiO₂ Nanocrystals*. Advanced Materials, 2005: p. 1991-1995.
19. Ren, J., H. He, and C. Xie, *Nonbleaching Fluorescence of Gold Nanoparticles and Its Applications in Cancer Cell Imaging*. Anal. Chem., 2008: p. 5951–5957.
20. Swapp, S. *Scanning Electron Microscopy (SEM)*. 2013; Available from: http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html.
21. Baer, D.R. and M.H. Engelhard, *XPS analysis of nanostructured materials and biological surfaces*. Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena, 2010. **178–179**(0): p. 415-432.
22. *Photoelectron Spectroscopy*. Available from: http://www.chem.qmul.ac.uk/surfaces/scc/scat5_3.htm.
23. Williams, D.B.A. and C.B. Carter, *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science. Diffraction. II* 1996: Springer London, Limited.
24. Šoberová, T., *Metoda negativního kontrastu pro diagnostiku virů a bakterií v transmisním elektronovém mikroskopu* in *Zdravotně sociální fakulta* 2009, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích České Budějovice. p. 60.
25. MyScope. *Background information - What is energy dispersive X-ray spectroscopy?*; Available from: <http://www.ammrf.org.au/myscope/analysis/eds/>.
26. Petra, S. and H. Elke, *Fluorescence Correlation Spectroscopy*, in *An Introduction to its Concepts and Applications*.
27. Mravec, F. *Fluorescenční korelační spektroskopie*. [cited 2013 2.5]; Available from: <http://www.materials-research.cz/cz/laboratore/laborator-biokoloidu/fluorescencni-korelacni-spektroskopie/>.

28. Kodoyianni, V., *Label-free analysis of biomolecular interactions using SPR imaging*. BioTechniques, 2011. **50**: p. 32-40.
29. Li, W., Y. Guo, and P. Zhang, *General Strategy to Prepare TiO₂-Core Gold-Shell Nanoparticles as SERS-Tags*. J. Phys. Chem., 2010: p. 7263-7268.
30. Merkoçi, A., *Nanoparticles-based strategies for DNA, protein and cell sensors*. Biosensors and Bioelectronics, 2010. **26**(4): p. 1164-1177.
31. Zhou, X., et al., *The effect of conjugation to gold nanoparticles on the ability of low molecular weight chitosan to transfer DNA vaccine*. Biomaterials, 2008: p. 111-117.
32. Wang, S., et al., *Photothermal effects of supramolecularly assembled gold nanoparticles for the targeted treatment of cancer cells*. Angew. Chem. Int. Ed., 2010: p. 3865-3869.
33. Scheinberg, D.A., et al., *Conscripts of the infinite armada: Systemic cancer therapy using nanomaterials*. Nat. Rev. Clin. Oncol., 2010: p. 266-276.
34. Sun, L., D. Liu, and W. Z., *Functional gold nanoparticle-peptide complexes as cell targeting agents*. Langmuir, 2008. **24**: p. 10293-10297.
35. Upadhyayula, V.K.K., *Functionalized gold nanoparticle supported sensory mechanisms applied in detection of chemical and biological threat agents*. Analytica Chimica Acta, 2012: p. 1-18.
36. TMPO. [cited 2013 23.5.]; Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/genes/ING:8om?saGeneTab=1>.
37. Mravec, F. *Fluorescenční spektroskopie*. [cited 2013 2.5.]; Available from: <http://www.materials-research.cz/cz/laboratore/laboratorbiokoloidu/fluorescencni-spektroskopie/>
38. Fišar, Z. *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách: Principy fluorescenční spektroskopie*. [cited 2013 5.2.]; Available from: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>.
39. Dzuro, M., *Příprava nanostruktur s využitím nanoporézní masky*, in *Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií 2012*, Vysoké učení technické v Brně: Brno. p. 38.
40. Castro-Lopez, M., et al., *Aluminum for Nonlinear Plasmonics: Resonance-driven Polarized Luminescence of Al, Ag, and Au Nanoantennas*, in *Conference on Lasers and Electro-Optics 2012*: New York.
41. Singh, S., et al., *Conjugation of nano and quantum materials with bovine serum albumin (BSA) to study their biological potential*. Journal of Luminescence, 2013. **141**(0): p. 53-59.